

Verfahren zur Selektion von Biomolekülen aus Varianten-Bibliotheken von Biomolekülen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion von Biomolekülen aus Varianten-Bibliotheken von Biomolekülen, insbesondere von Enzymen oder anderen biokatalytisch aktiven Biomolekülen. Biomoleküle finden vielseitige Verwendung in technologischen oder medizinischen Anwendungen und Prozessen. Viele der dafür benötigten Eigenschaften der Biomoleküle sind in der Natur so nicht vorhanden oder noch nicht identifiziert worden. Die Generierung solcher neuen Eigenschaften aus vorhandenen Biomolekülen erfordert die Herstellung sehr großer Varianten-Bibliotheken mit zufällig veränderten Zusammensetzungen durch Einführung von Mutationen. Die Identifizierung der Varianten mit den gesuchten Eigenschaften erfordert geeignete Selektions- oder Durchmusterungs-Verfahren.

Das zufällige Einführen von Mutationen in das genetische Material ist auch die Triebfeder der natürlichen Evolution. Natürliche Systeme replizieren dabei mit Mutationsraten, die gerade knapp unter der so genannten Fehlerschwelle liegen. Die Fehlerschwelle ist dabei die maximale Mutationsrate, die gerade nicht zum Aussterben der Population führt. Bei Mutationsraten unterhalb der Fehlerschwelle werden genügend Variationen in einer Population angehäuft, um der Population eine schnell Anpassung an veränderte Bedingungen zu ermöglichen. Mutationsraten über der Fehlerschwelle führen hingegen nach einigen Generationen dazu, dass keine überlebensfähigen bzw. replizierbaren Individuen mehr vorhanden sind, und die Population zusammenbricht (Eigen, M., McCaskill, J., Schuster, P.: The molecular quasispecies. Adv. Chem. Phys. 1989. 75. 149-263).

Neue Biomoleküle können durch die Verknüpfung der neuen Eigenschaft an das Überleben oder einen hinreichend großen Wachstumsvorteil eines Organismus erzeugt werden. Hierbei wird die Varianten-Bibliothek in einen entsprechenden Organismus überführt und die Wachstumsbedingungen so gewählt, dass nur die Individuen überleben oder vergleichsweise schneller wachsen, welche eine Variante des Biomoleküls mit der gesuchten neuen Eigenschaft produzieren (Zaccolo M, Gherardi E.

The effect of high-frequency random mutagenesis on in vitro protein evolution: a study on TEM-1 beta-lactamase. J. Mol. Biol. 1999. 285, 775-83. oder Samuelson JC, Xu SY. Directed evolution of restriction endonuclease BstYI to achieve increased substrate specificity. J. Mol. Biol. 2002. 319,673-83). Diese Anwendung ist nur auf die Selektion eines eng begrenzten Kreis von Biomolekülen anwendbar, die einem gewählten Organismus einen Vorteil verschaffen können. Biomoleküle, welche beliebige chemische Reaktionen katalysieren, sind so nicht selektierbar. Da der Organismus über den gesamten Selektionszeitraum am Leben bleiben muss, sind toxische oder anderweitig für ein Wachstum nachteilige Eigenschaften nicht selektierbar.

Eine weitere Methode zur Selektion neuer Biomoleküle ist die Verknüpfung des Biomoleküls mit der codierenden Nukleinsäure-Sequenz (Amstutz P, Forrer P, Zahnd C, Pluckthun A. In vitro display technologies: novel developments and applications. Curr. Opin.Biotechnol. 2001. 12. 400-5. Xia G, Chen L, Sera T, Fa M, Schultz PG, Romesberg FE. Directed evolution of novel polymerase activities: mutation of a DNA polymerase into an efficient RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. 99. 6597-602. Pschorr J. Genotyp und Phänotyp koppelnde Verbindung. DE0019646372C1). Eine Anwendung dieser Technologien mit lebenden Organismen wie Phagen oder Bakterien beschränkt das Spektrum wiederum auf nicht toxische oder nicht wachstumshemmende Biomoleküle. Ebenso dürfen Substrate und Produkte der gesuchten Reaktion auf den präsentierenden Organismus nicht schädigend einwirken. Zusätzlich lassen sich katalytische Aktivitäten nur selektieren, wenn sich Biomolekül und Substrat an dem gleichen Organismus präsentieren lassen. Da sich die Aktivität der katalytischen Biomoleküle nicht auf den sie präsentierenden Organismus begrenzen lässt und diese somit auch Reaktionen an anderen Individuen der Bibliothek stattfinden können, führt diese Methode häufig zur Falsch-Selektion von Biomolekülen.

Bei den Durchmusterungs-Verfahren (Screening-Verfahren) wird jede Variante einer Biomolekül-Bibliothek einzeln hinsichtlich der gesuchten Eigenschaft untersucht. (Joo H, Lin Z, Arnold FH. Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation. Nature. 1999. 399. 670-3. Korbel GA, Lalic G, Shair MD. Reaction microarrays: a method for rapidly determining the enantiomeric excess of thousands of

samples. J. Am. Chem. Soc. 2001. 123. 361-2.) Selbst bei sehr kurzen Messzeiten (z. B. 100 ms pro Variante) erfordert diese Methode einen sehr hohen Zeitaufwand (z.B. 22 Tage) für die Untersuchung großer Bibliotheken (z.B. 10^7). Das kontinuierliche Messen von Varianten in diesen Größenordnungen erfordert den Aufbau entsprechend komplexer Apparate. Außerdem muss für jede Variante der Bibliothek ein entsprechender Eigenschaftstest durchgeführt werden, was zu sehr hohen Kosten dieser Methoden führt.

Zum Screenen oder zur Veränderung von Enzymeigenschaften im Labor, dem sogenannten „Enzym Engineering“ müssen nach dem Stand der Technik in einer Enzymlbibliothek Genotyp (eine Nukleinsäure, die vervielfältigt werden kann und eine Variante eines Gens umfasst) und Phänotyp (ein funktionales Merkmal, wie z. B. eine katalytische Eigenschaft) aneinander gekoppelt werden. Diese Kopplung wird z. B. durch Techniken, wie Phage-Display oder Ribosomen-Display erreicht oder dadurch, dass jeder Genotyp einzeln auf einen Phänotyp getestet wird.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es ein Verfahren zur Identifizierung von Biomolekülen in Varianten-Bibliotheken von Biomolekülen anzugeben.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur Selektion von Biomolekülen aus Varianten-Bibliotheken von Biomolekülen umfassend die Schritte:

a.) Herstellung einer Varianten-Bibliothek, bestehend aus einer Anzahl (B_0) von Varianten der für das Biomolekül codierenden Gensequenz,

b.) Aufteilung der Variantenbibliothek in eine Anzahl von Kompartimenten (W_0), die bevorzugt um einen Faktor 10, mehr bevorzugt einen Faktor 100, kleiner ist als die Anzahl (B_0) der in der Varianten-Bibliothek enthaltenen Varianten,

wobei jedes Kompartiment eine Teilbibliothek enthält, die $K_0 = B_0/W_0$ Varianten enthält,

c.) Produktion von Biomolekülen in den Kompartimenten, und Test der in den einzelnen Kompartimenten erhaltenen Biomoleküle auf eine

bestimmte Eigenschaft (Phänotyp), bevorzugt eine biokatalytische Aktivität, wobei aus dem beobachteten Phänotyp keine direkten Rückschlüsse auf den Genotyp möglich sind,

5 d.) Auswahl mindestens eines Kompartiments, in dem Biomoleküle enthalten sind, welche die gewünschte Eigenschaft, bevorzugt eine biokatalytische Aktivität, erfüllen,

e.) Aufteilung der in dem ausgewählten Kompartiment enthaltenen Teilbibliothek in weitere Kompartimente entsprechend Schritt b.) und

10 f.) n-faches Wiederholen der Schritte c.) bis e.) bis in jedem Kompartiment nur noch maximal eine Variante ($K_n \leq 1$) der für das Biomolekül codierenden Gensequenz enthalten ist.

15 Dieses Verfahren ist insbesondere zur Generierung von Biomolekülen mit neuen katalytischen Aktivitäten geeignet, die entweder in der Natur gar nicht vorkommen oder zumindest von dem gewählten Ausgangs-Biomolekül so nicht katalysiert werden. Außerdem können mit diesem Verfahren vorhandene katalytische Aktivitäten an äußere Bedingungen, wie z.B. Temperatur oder Lösungsmittel, angepasst werden, unter denen bisher keine oder nur verschwindend geringe Aktivität vorhanden war.

20 Da eine Produktion der Biomoleküle in der vorliegenden Erfindung zu einem Absterben der Organismen führen kann oder durch zellfreie Systeme erfolgen kann, kann das Verfahren auf alle Arten von Biomoleküle angewandt werden und ist nicht auf nicht toxische oder nicht wachstumshemmende Aktivitäten begrenzt. Da bis zu einer Million oder mehr Varianten mit einem Test und gleichzeitig auf die entsprechende Eigenschaft hin untersucht werden, reduziert sich die für das Durchmustern der Bibliothek
25 benötigten Zeit und die für die Eigenschaftstests benötigten Kosten um einen entsprechenden Faktor. Varianten, welche die gesuchten Eigenschaften aufweisen, können sicher und reproduzierbar aus den ursprünglichen Varianten-Gemischen isoliert werden.

30 Im Schritt a.) des Verfahrens wird eine Varianten-Bibliothek der für das Biomolekül codierenden Gensequenz mittels Standardmethoden der Molekularbiologie hergestellt.

Unter Variantenbibliothek wird im Sinne der vorliegenden Erfindung verstanden: Mischung aus Proteinen oder Nukleinsäuren, welche sich in mindestens einer Position in ihrer Sequenz voneinander unterscheiden.

- 5 Bevorzugt besteht die Variantenbibliothek aus einer Anzahl von Varianten in einem Größenbereich von $B_0 = 10^3$ bis $B_0 = 10^{15}$. So können zum Beispiel in einen Teilbereich des Biomoleküls zufällig gewählte Sequenzbausteine eingeführt werden, so dass im Fall einer Nukleinsäure bei 25 geänderten Positionen eine Bibliotheksgröße von $4^{25} = 1,1 \times 10^{15}$ oder im Fall eines Proteins bei 7 geänderten Positionen eine Bibliotheksgröße von $20^7 = 1,3 \times 10^9$ entstehen kann.
- 10

Besonders bevorzugt liegt der Größenbereich zwischen $B_0 = 10^5$ bis $B_0 = 10^9$.

Besonders bevorzugt besteht die Variantenbibliothek aus DNA-Plasmiden oder linearen Nukleinsäuremolekülen, welche die für das Biomolekül codierende Gensequenz enthalten.

- 15 Biomoleküle im Sinne des vorliegenden Erfindung sind Proteine, Nukleinsäuren oder andere aus organischen Bausteinen bestehende Biopolymere. Bevorzugt sind diese Biomoleküle, Enzyme oder Ribozyme oder andere Biomoleküle, die als Biokatalysatoren, die Umsetzung chemischer oder biochemischer Stoffe beschleunigen können.
- 20 Standardmethoden der Molekularbiologie mit denen eine solche Variantenbibliothek hergestellt werden kann, sind beispielsweise fehlerhafte Vervielfältigungsmethoden für Nukleinsäuren. Hierfür werden replizierende Enzyme, z.B. Polymerasen, welche die Neusynthese eines Biomoleküls mit Hilfe einer Matrize durchführen, angewandt. Die Einführung von Fehlern und somit die Erzeugung von unterschiedlichen Varianten
- 25 erfolgt entweder durch die natürlich vorhandene Fehlerrate dieser replizierenden Enzyme oder kann durch Veränderung der Reaktionsbedingungen (z.B. Ungleichgewicht der Synthesebausteine, Zugabe von Baustein-Analoga, Veränderung der Puffer-Zusammensetzung) erhöht werden. Neben der Einführung von Fehlern kann

eine Variantenbibliothek unter Ausnutzung der natürlich vorkommenden Diversität für ein bestimmtes Biomolekül oder eine Biomolekülklasse erzeugt werden.

Im Vergleich zu herkömmlichen Screeningverfahren erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren das Screening von sehr großen Bibliotheken. Das erfindungsgemäße Aufteilungsverfahren ermöglicht das gleichzeitige Testen von beliebig vielen Varianten.

Limitiert wird die Größe der Bibliothek nur durch die Sensitivität des Assays, mit dem die in den einzelnen Kompartimenten erhaltenen Biomoleküle auf eine bestimmte Eigenschaft, bevorzugt eine biokatalytische Aktivität, in Schritt c.) des Verfahrens getestet werden.

- 10 Vorzugsweise werden die Bibliotheken durch fehlerhafte PCR oder das Einfügen synthetisch randomisierter Sequenzabschnitte hergestellt (Cadwell RC, Joyce GF. Randomization of genes by PCR mutagenesis. PCR Methods Appl. 1992. 2. 28-33; (Wells JA, Vasser M, Powers DB. Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites. Gene. 1985. 34. 315-23).
- 15 Die Mutationsrate wird dabei bevorzugt deutlich über der Fehlerschwelle gewählt. Dadurch sind in der Ausgangsbibliothek bevorzugt mehr als 90 % , bevorzugt mehr als 99 % und besonders bevorzugt mehr als 99,9 % der erstellten Varianten nicht überlebensfähig sind.

- Die Fehlerschwelle ist definiert als die maximale Mutationsrate, die bei evolutionären Methoden (zyklische Anwendung von Mutation und Selektion) gerade nicht zu einem Zerfließen der genetischen Information führt und somit die Überlebensfähigkeit einer Population erhält. Ein Zerfließen der genetischen Information wird definiert als ein Vorgang, bei dem durch wiederholtes Anlegen einer zu hohen Mutationsrate beim Replizieren einer Nukleinsäuresequenz sich so viele Mutationen anhäufen, dass die
- 25 Nukleinsäure dann keine physiologisch sinnvolle Information mehr enthält.

Überlebensfähigkeit für ein Gen bzw. Genprodukt wird dabei so definiert, dass das Gen bzw. sein Genprodukt seine physiologische Aktivität wie zum Beispiel die Bindung eines Partners oder die katalytische Spaltung eines Substrates noch wahrnehmen kann.

Ein wichtiger Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahren gegenüber etablierten Verfahren, die Mutagenese- und Selektionsschritte enthalten, besteht darin, dass im erfindungsgemäßen Verfahren von einer großen Bibliothek ausgegangen wird, die von vornherein die gewünschte Variante enthält. D. h. man erhält nach dem Screening nicht eine suboptimale Variante, die durch weitere Mutations- oder Rekombinationszyklen weiter verbessert werden muss.

- 10 Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass zu Beginn einmalig im Schritt a.) eine Varianten-Bibliothek erstellt wird, welche im Anschluss auf Varianten mit der gewünschten Eigenschaft durchmustert wird. Ab dem Schritt b.) erfolgen keine weiteren Mutagenese oder Rekombinationsschritte. D. h. zwischen oder während den einzelnen Vereinzelungsschritten (Schritte b. bis f.) werden die dabei
- 15 isolierten Teilbibliotheken keiner weiteren Mutagenese oder Rekombination unterzogen. D. h. die am Ende des Verfahrens isolierten Varianten mit den gewünschten Eigenschaften sind bereits in der initialen (in Schritt a.) eingesetzten Bibliothek vorhanden.

- Bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren so durchgeführt, dass in Schritt d.) in
- 20 allen Durchgängen nur ein Kompartiment ausgewählt wird und zwar das in dem die gewünschte Eigenschaft (Phänotyp) am stärksten ausgeprägt ist, vorzugsweise das Kompartiment mit der stärksten biokatalytischen Aktivität. Dabei kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren die beste Variante isoliert werden, in der die gewünschte Eigenschaft (Phänotyp) am stärksten ausgeprägt ist, ohne dass eine Auswahl von
- 25 suboptimalen Varianten oder von Gruppen von Varianten zwingend erforderlich ist.

Bei dem Erstellen der Variantenbibliothek wird vorzugsweise von einer bereits bekannten Nukleinsäure- oder Proteinsequenz ausgegangen, nachfolgend Ausgangssequenz genannt. Basierend auf dieser Ausgangssequenz wird mit den oben

genannten Methoden (z. B. fehlerhafter PCR oder durch das Einfügen synthetisch randomisierter Sequenzabschnitte) die Variantenbibliothek hergestellt

Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich weiterhin dadurch aus, dass die Ausgangssequenz nicht mehr in der Variantenbibliothek enthalten sein muss.

- 5 Die Ausgangssequenz codiert häufig für einen Phänotyp der der gewünschten Eigenschaft zu einem gewissen Grade ähnlich ist. So wird man, z. B. wenn man als gewünschte Phänotyp eine RNase erhalten will, die hinter einem Adenosin schneidet, als Ausgangssequenz z. B. eine RNase, die hinter einem Guanodin schneidet, wählen (und nicht etwa eine Protease).
- 10 Umso ähnlicher die Ausgangssequenz in ihrem Phänotyp der gewünschten Eigenschaft jedoch ist, desto größer ist jedoch in der Regel auch die Hintergrundsaktivität in dem Test in Schritt c.) des Verfahrens. Vorteilhaft wird dieser Hintergrund vermieden, wenn die Ausgangssequenz nicht mehr in der Variantenbibliothek enthalten ist.

- Bevorzugt wird die Variantenbibliothek daher so hergestellt, dass die Ausgangsvariante nicht mehr in der Variantenbibliothek enthalten ist. Dies kann zum Beispiel dadurch erreicht werden, dass in die Ausgangssequenz ein Stop-Codon eingefügt wird, welches durch das Einsetzen der mutierten Abschnitte in die Ausgangssequenz wieder entfernt wird. Somit wird sichergestellt, dass eventuell verschleppte Ausgangssequenzen durch das Stop-Codon physiologisch nicht aktiv sind und auf der anderen Seite, physiologisch
- 15 aktive Varianten mutierte Bereiche enthalten müssen.
- 20

- Im Gegensatz zu den nach dem Stand der Technik eingesetzten High-Throughput-Verfahren ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren ein Durchsuchen von um ein Vielfaches größerer Bibliotheken in einem Bruchteil der Zeit. Im Vergleich zu *in vivo* Selektionsverfahren ist das erfindungsgemäße Verfahren auch nicht limitiert auf
- 25 bestimmte Enzymklassen bzw. bestimmte Enzymeigenschaften.

Im Schritt b.) wird die Variantenbibliothek in eine Anzahl W_0 von Kompartimenten, die mindestens um einen Faktor 10, bevorzugt einen Faktor 100, kleiner ist, als die Anzahl der in der Varianten-Bibliothek enthaltenen Varianten, aufgeteilt.

5 Hierbei kann vor der Aufteilung die Überführung der Variantenbibliothek in einen Organismus erfolgen oder die Aufteilung auf Ebene der codierenden Sequenzen erfolgen. Die Aufteilung erfolgt so, dass jede Variante der Bibliothek mindestens einmal, bevorzugt genau einmal, vorkommt.

Die dann im Schritt c.) durchgeführte Produktion (Expression) der Biomoleküle erfolgt bevorzugt durch den Organismus oder durch *in vitro* Expressionssysteme (z.B. 10 Zellextrakte).

Als Expressions-Organismus kommen alle in der Molekularbiologie standardmäßig zu Expression von Biomolekülen, wie Proteinen, verwendeten Organismen in Betracht, der Expressionsorganismus wird dabei in Abhängigkeit des zu exprimierenden Biomoleküls gewählt. Bevorzugte Expressionsorganismen sind bakterielle Zellen (z.B. *E. coli*, *B. subtilis*) oder eukaryontische Zellen (z.B. *S. cerevisiae*, Insektenzellen, Tumorzellen). 15

Durch die Überführung der Variantenbibliothek in den Expressionsorganismus entstehen einzelne Klone des Expressionsorganismus. Dabei enthält ein Klon jeweils einen definierten Genotyp, d. h. eine Variante der für das Biomolekül codierenden Gensequenz. Ein Klon kann im Sinne der vorliegenden Erfindung auch durch eine 20 alleinige codierende Sequenz definiert sein, d. h. einen definierten Genotyp ohne Expressionsorganismus.

Diese Überführung in einen Organismus geschieht durch die bekannten Methoden der Molekularbiologie für die Transformation von Gensequenzen in Expressionsorganismen und ist abhängig von dem verwendeten Expressionsorganismus. Eine bevorzugte 25 Methode ist die Elektroporation.

Bevorzugt erfolgt die Aufteilung in Kompartimente sofort nach der Überführung der Variantenbibliothek in den Expressionsorganismus.

Die Anzahl W_0 der Kompartiment beträgt bevorzugt zwischen 10^1 und 10^4 Kompartimenten und besonders bevorzugt zwischen 96 und 1536 Kompartimenten.

Die Bibliotheksgröße B_0 dividiert durch die Kompartiment-Anzahl W_0 ergibt die Klon-Anzahl K_0 pro Kompartiment, $K_0 = B_0 / W_0$.

- 5 Jedes Kompartiment enthält eine Teilbibliothek mit einer Anzahl von K_0 Varianten der für das Biomolekül codierenden Gensequenz.

Besonders bevorzugt erfolgt die Aufteilung in die Kompartimente einer Mikrotiter- bzw. Deepwellplatte mit $W_0 = 96$ Kompartimenten

- 10 Bevorzugt erfolgt im Schritt c.) eine Vervielfältigung der Teilbibliotheken in den Kompartimenten durch Wachstum der Organismen oder Vervielfältigung der codierenden Sequenzen durch Matrizen-abhängige Enzyme bis zu einer Individuen-Anzahl V_0 pro Kompartiment und Produktion der katalytischen Biomoleküle durch die Expressionsorganismen oder zellfreie Expressionssysteme, wie z.B. *E. coli* Lysate, Reticulocyten-Lysate, *C. lucknowese* Lysate oder Insektenzellen-Lysate.

15

Bevorzugt erfolgt nun eine Konservierung eines Anteils der Teilbibliothek auf Organismen-Ebene oder der Ebene reiner codierender Sequenzen zum Zeitpunkt x unter Beibehaltung der Kompartiment-Zuordnung.

- 20 Die Konservierung von Organismenkulturen erfolgt bevorzugt durch die Herstellung einer 1:1 Mischung aus Organismen-Kultur und Glycerol und Lagerung dieser Mischung unter Wachstumsinhibition bei -80°C . Eine Konservierung auf Ebene der codierenden Sequenzen erfolgt durch Abnahme eines Anteils der vervielfältigten Sequenzen und Lagerung, bevorzugt bei -20°C .

- 25 Eine Bestimmung der Individuen-Anzahl $V_0(x)$ der konservierten Teilbibliothek auf Organismen-Ebene erfolgt bevorzugt durch Messung der optischen Dichte OD einer flüssigen Organismen-Kultur und Korrelation mit der Individuen-Anzahl oder Überführung eines Aliquot dieser Kultur auf ein Festmedium und Auszählen der daraus resultierenden Kolonien. Die Bestimmung der Individuen-Anzahl $V_0(x)$ der

konservierten Teilbibliothek auf Ebene codierender Sequenzen erfolgt bevorzugt durch Konzentrationsbestimmung mittels spektroskopischer Methoden.

Die Individuen-Anzahl $V_0(x)$ dividiert durch die Klonanzahl pro Kompartiment K_0 ergibt den Vervielfältigungsfaktor $F_0(x)$ pro Klon, $F_0(x) = V_0(x) / K_0$.

- 5 Im Schritt c.) des Verfahrens werden die in den einzelnen Kompartimenten enthaltenen Biomoleküle auf eine bestimmte Eigenschaft (Phänotyp), bevorzugt eine biokatalytische Aktivität, getestet.

- Bevorzugt erfolgt in Schritt c.) eine Vervielfältigung der Teilbibliothek in den Kompartimenten bis zu einer Individuen-Anzahl $V_0(x)$ zum Zeitpunkt x pro
10 Kompartiment, wobei die Individuen-Anzahl $V_0(x)$ dividiert durch die Klonanzahl pro Kompartiment K_0 den Vervielfältigungsfaktor $F_0(x)$ pro Klon ergibt.

- Vor, während oder nach dem Wachstum der Organismen oder der Vervielfältigung der Genotypen erfolgt dabei die Produktion der Biomoleküle in den einzelnen
15 Kompartimenten.

- Bevorzugt erfolgt der Test auf eine biokatalytische Aktivität durch Inkubation der in dem Kompartiment enthaltenen oder aus diesen isolierten katalytisch aktiven Biomoleküle mit entsprechenden Substraten und Zuordnung von Aktivitätswerten zu
20 den jeweiligen Kompartimenten. Kompartimente in denen der Aktivitätswert eine definierte Schwelle überschreitet, werden als positiv gewertet.

- Da jedes Kompartiment mehr als einen Klon der Variantenbibliothek enthält, lässt sich aus dem beobachteten Phänotyp keine direkten Rückschlüsse auf den Genotyp machen, da der beobachtete Phänotyp durch die Summe der im Kompartiment enthaltenen Klone
25 resultiert.

Obwohl im erfindungsgemäßen Verfahren daher Genotyp und Phänotyp entkoppelt sind lässt sich mit dem erfindungsgemäßen Verfahren der für die gewünschte Eigenschaft verantwortliche Klon, der zum Beispiel die gewünschte Enzymaktivität enthält, aus dem Gemisch der Klone wiederfinden und isolieren. Dass es möglich ist mit einem

Screeningverfahren bei dem Genotyp und Phänotyp entkoppelt sind, den für die gewünschte Eigenschaft verantwortlichen Klon aus dem Gemisch der Klone wiederzufinden und zu isolieren ist für die Fachwelt überraschend, da alle bekannten Screeningverfahren auf der Kopplung von Genotyp und Phänotyp beruhen.

- 5 Den Klon mit der gewünschten Eigenschaft wiederzufinden wird durch die Schritte d.), und e.) des erfindungsgemäßen Verfahrens erreicht.

Im Schritt d.) des Verfahrens wird mindestens ein Kompartiment ausgewählt in dem Biomoleküle enthalten sind, welche die gewünschten Eigenschaften erfüllen.

- Die in diesem Kompartiment enthaltene Teilbibliothek wird nun im Schritt e.) des
10 Verfahrens entsprechend Schritt b.) erneut in Kompartimente aufgeteilt

Vorzugsweise wird dazu die Teilbibliothek oder die entsprechende konservierte Teilbibliothek anhand des Faktor $F_0(x)$ so verdünnt, dass in einem gegebenen Volumen jeder in dem Kompartiment enthaltene Klon statistisch bis zu einer Anzahl $X_0 < W_1$ vorkommt. Dieses Volumen wird wiederum ohne vorherige Vervielfältigung auf neue
15 Kompartimente der Anzahl W_1 aufgeteilt. Die neue Klonanzahl pro Kompartiment $K_1 = X_0 * K_0 / W_1$.

Nun werden die Schritte c.) bis e.) des Verfahrens solange wiederholt bis die Anzahl der Klone pro Kompartiment $K_n \leq 1$. Sobald $K_n \leq 1$ erreicht ist, ist der gesuchte Phänotyp einen einzelnen Genotyp zugeordnet.

- 20 Um den Verlust von Einzelklonen und somit Varianten der Bibliothek von Biomolekülen zu verhindern, wird der Schritt e.) bevorzugt in der Weise ausgeführt, dass in den ersten Durchläufen des Schritts e.) $1 < X_{n-1} < W_1$ gilt, bevorzugt $X_{n-1} = 3$ bis 5.

- Der Schritt e.) wird bevorzugt solange wiederholt, bis der den gesuchten Phänotyp verursachende Klon innerhalb der neu-kompartimentierten Teilbibliothek zu finden ist.
25 Hierbei ist bevorzugt im letzten Durchlauf des Schritts e.) $X_n < 1$. Vorzugsweise wird dazu bei der letzten Durchführung des Schrittes e.) die Teilbibliothek so verdünnt, dass

maximal ein Klon pro Kompartiment zu finden ist und in vielen Kompartimenten kein Klon mehr enthalten ist. Damit gibt sich ein durchschnittlicher Wert von $X_n < 1$.

Im Schritt f.) werden die Schritte c.) bis e.) n-fach wiederholt bis in jedem Kompartiment nur noch maximal eine Variante ($K_n \leq 1$) der für das Biomolekül codierenden Gensequenz enthalten ist.

Die Anzahl der nötigen Wiederholungen n ist dabei abhängig von der Anzahl von Varianten (B_0) der in Schritt a.) eingesetzten Varianten-Bibliothek, der Anzahl der Kompartimente (W_n) in welche die Bibliotheken in Schritt b.) und e.) aufgeteilt werden und der Anzahl X_n , mit der ein einmal gefundener Klon im nächsten Zyklus wiedervorhanden ist. Die Anzahl der durchgeführten Wiederholungen n beträgt dabei bevorzugt bei konstantem $X_n = 1$ und konstantem W_n :

$$n = \log_{10}(B_0) - \log_{10}(W_n) \quad \text{oder} \quad n = (\log_{10}(B_0) - \log_{10}(W_n)) + 1,$$

wobei gegebenenfalls n auf die nächst höhere ganze Zahl aufgerundet wird.

Wird in Schritt a.) z. B. eine Bibliothek mit $B_0 = 10^6$ Varianten eingesetzt und werden die Teilbibliotheken in Schritt b.) und e.) jeweils mit $X_n = 1$ in $W_n = 96$ oder $W_n = 100$ Kompartimente aufgeteilt, sind n = 4 bis 5 Durchläufe der Schritte c.) bis e.) notwendig, um den Klon mit der gewünschten Aktivität wiederzufinden.

Anhand der nachfolgenden Ausführungsbeispiele wird die Erfindung näher erläutert:

Ausführungsbeispiel 1 beschreibt als Beispiel die Selektion von aktiver RNase T1 aus einer Variantenbibliothek von inaktiven Varianten von RNase T1.

Ausführungsbeispiel 2 beschreibt als Beispiel die Selektion einer nach Adenosin
5 spaltenden RNase T1 aus einer Bibliothek von RNase T1-Varianten

Ausführungsbeispiel 1

1. Klonierung der Gene für RNase T1 Wildtyp und His92Ala

Mit den beiden Primern A2Vo_BspHI (SEQ_ID No. 1) und A2Hi_PstI (SEQ_ID No. 2) (beide IBA Göttingen) werden die für RNase T1 Wildtyp (SEQ_ID No. 3) und die
10 RNase T1 Variante His92Ala (SEQ_ID No. 4) codierenden Gene inklusive des Signalpeptides für eine periplasmatische Expression aus dem jeweiligen Ursprungsvektoren pA2T1 (SEQ_ID No. 5) und pA2T1_H92A (SEQ_ID No. 5, in dem SEQ_ID No. 3 durch SEQ_ID No. 4 ersetzt ist) durch eine PCR unter den nachfolgenden Bedingungen amplifiziert.

15 1.1 PCR:

PCR-Ansatz:	10 µl	10x VENT-Puffer (NEB, Beverly, USA)	
	2 µl	dNTPs (je 10 mmol/Liter)	
	100 pmol	Primer A2Vo_BspHI	(SEQ_ID No. 1)
	100 pmol	Primer A2Hi_PstI	(SEQ_ID No. 2)
20	1 µl	Ursprungsvektor (20 ng)	(SEQ_ID No. 5)
	2 U	VENT-Polymerase (NEB)	
	ad 100 µl	H ₂ O dest.	

Temperaturprofil der PCR: 2 min / 94 °C

25	1.	45 sec / 94 °C (Denaturierung)	} 25 x
	2.	45 sec / 57 °C (Anlagerung)	
	3.	30 sec / 72 °C (Elongation)	
		2 min / 72 °C	

Die resultierenden PCR-Produkte werden mittel des QIAquick PCR-Reinigungs-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift gereinigt.

1.2 Restriktionsverdau:

Zur Klonierung der Gene in den Expressionsvektor pETBlue-2 (SEQ ID No. 6) werden die PCR-Produkte und der Vektor mittels Restriktionsendonucleasen BspHI und PstI bzw. NcoI und PstI (alle MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) wie folgt inkubiert:

Restriktionsverdau-Ansätze:

10	PCR-Produkte:	Vektor:
	2 µg PCR-Produkt	4 µg pETBlue-2
	2 µl 10x Puffer O ⁺ (MBI)	2 µl 10x Puffer Y ⁺ (MBI)
	10 U BspHI	10 U NcoI
15	10 U PstI	10 U PstI
	ad 20 µl H ₂ O dest.	ad 20 µl H ₂ O dest.

Die Restriktionsverdau-Ansätze werden 2 h bei 37 °C inkubiert. Zu dem „Vektor-Ansatz“ wird anschließend zur Dephosphorylierung 1 U SAP (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) hinzu gegeben und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Enzyme für 20 min bei 80 °C inaktiviert. Daraufhin werden die Produkte mittels des QIAquick PCR-Reinigungs-Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

1.3 Ligation, Transformation in *E. coli* und Plasmid-Reisolation

Die Vektor-DNA und das PCR-Produkt werden durch die Inkubation mit T4-DNA-Ligase wie folgt miteinander verbunden:

	Ligase-Ansatz:	200 fmol Vektor-DNA
		600 fmol PCR-Produkt
		3 µl 10x Ligase-Puffer (MBI)
30		1 µl T4-DNA-Ligase
		ad 30 µl H ₂ O dest.

Die Ansätze werden 8 h bei 16 °C inkubiert und anschließend wurde das Enzym durch 10-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert. 1 µl dieses Ansatzes wurde direkt zur Transformation kommerziell erhältlicher kompetenter ElectroTen-Zellen (Stratagene, La Jolla, USA) mittels Elektroporation eingesetzt. Die elektroporierten Zellen wurden auf Festagar-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Ausgehend von einer resultierenden Einzelkolonie wird das fertige Plasmid mittels des Plasmid-Reinigungskits QIAprep Minipräparations-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift reisoliert.

1.4 Herstellung einer Plasmid-Mischung als RNase T1-Testbibliothek:

- 10 Als Resultat aus den vorangegangenen Schritten werden die beiden Plasmide pETBlue-RNaseT1-Wildtyp und pETBlue-RNaseT1-His92Ala erhalten.

Zur Herstellung einer Testbibliothek werden die Plasmide wie folgt gemischt:

1 pg pETBlue-RNaseT1-Wildtyp wird mit 1 µg pETBlue-RNaseT1-His92Ala gemischt. Dadurch erhält man ein Verhältnis von 1 : 1.000.000 aus RNase T1 Wildtyp (aktiv) und der Variante His92Ala (inaktiv).

1.5 Herstellung des Expressionsstammes:

- Für die Expression der RNase T1-Testbibliothek wird ein *E. coli* Stamm benötigt, bei dem die RNase I ausgeschaltet ist. Entsprechende Stämme, wie z. B. AT9 (rna-19 λ⁻gdhA2 relA1 spoT1 metB1) sind über das *E. coli* Genetic Stock Center New Haven, USA verfügbar. Der im Beispiel verwendete Expressionsvektor pETBlue-2 benötigt zusätzlich die T7-RNA-Polymerase für die Expression, welche in *E. coli* nicht vorhanden ist. Mit dem kommerziell erhältlichen λDE3-Lysogenisierungs-Kit (Novagen, Madison, USA) wird nach Herstellervorschrift das T7-RNA-Polymerase codierenden Gen in den *E. coli* Stamm AT9 eingeführt. Hierdurch erhält man einen *E. coli* Stamm, der sich durch die Abwesenheit von RNase I und das Vorhandensein der T7-RNA-Polymerase (DE3) auszeichnet. Von diesem Stamm wurden mittels Standard-Molekularbiologie-Methoden elektrokompente Zellen hergestellt und bei -80 °C gelagert.

1.6 Transformation des Expressionsstammes mit der Testbibliothek:

In den wie oben beschrieben hergestellten Expressionsstamm wird 1 ng der Plasmid-Mischung als Testbibliothek mittels Elektroporation transformiert und die resultierenden Zellen nach 1-stündigem Wachstum bei 37 °C in 10 ml Flüssigmedium (LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt (alles Becton Dickinson, Heidelberg), 10 g NaCl (Sigma, Deisenhofen)) mit Ampicillin aufgenommen

Die so erhaltene Vorkultur wird sofort auf eine 96-Well Mikrotiterplatte (MTP) aufgeteilt (je 100 µl pro well) und über Nacht bei 30 °C und 800 Upm inkubiert.

Durch die Transformationen mittels Elektroporation werden ca. 3 Millionen transformierte Klone erhalten.

1.7 Wachstum der Hauptkultur und Expression von RNase T1

Eine 96er Deepwellplatte (DWP) wird mit jeweils 1,5 ml Flüssigmedium mit Ampicillin pro Well befüllt. Das Medium wird mit jeweils 50 µl aus der Vorkultur-MTP beimpft und die DWP bei 37 °C und 800 Upm kultiviert. Beim Erreichen einer optischen Dichte OD₆₀₀ der Kulturen von OD₆₀₀ = 1,0 werden die Kulturen mit 1 mmol/Liter IPTG induziert. Anschließend wird die Platte für weitere 4 h bei 37 °C und 800 Upm inkubiert.

1.8 Präparation der Protein-Proben

Durch das Signalpeptid ompA werden die exprimierten RNase T1 – Moleküle in den periplasmatischen Raum des Expressionsbakteriums geleitet. Durch einen osmotischen Schock können die Proteine sehr leicht präpariert werden. Die Reinigungsprozedur umfasst dabei folgende Schritte:

- Sammeln der Zellen durch Zentrifugation bei 4000 Upm, 4 °C für 5 min,
- Abschütten des Medien-Überstandes,
- Resuspension des Bakterienpellets in jeweils 25 µl Puffer A (50 mmol/Liter Tris/HCl, pH 7,5, 10 mmol/Liter EDTA, 15 % Saccharose w/v),
- Inkubation auf Eis für 30 min,
- Zugabe von jeweils 125 µl Puffer B (50 mmol/Liter Tris/HCl, pH 7,5, 10 mmol/Liter EDTA),
- Zentrifugation bei 4000 Upm, 4 °C, für 20 min,
- Abnahme des Überstandes und Überführung in eine MTP (Periplasma),

- Aufbewahren der Bakterienpellets.

1.9 Herstellung des Substrates für RNase T1

Als Substrat (Sub_G) dient ein doppelsträngiges DNA-Molekül mit zentralem einzelsträngigen Bereich, welcher einen Guanosin-RNA-Baustein (rG) als Angriffspunkt für das Enzym enthält. Die Enden dieses Substrates sind mit unterschiedlichen Farbstoffen für den roten (Cy5 am 5'-Ende) und den grünen (RhG am 3'-Ende) Spektralbereich markiert. Um ein Ausbleichen der markierten Substrate zu verhindern, werden die entsprechenden Lösungen und Inkubationsansätze stets vor Licht geschützt. Die Puffer und Ansätze werden mit DEPC-behandeltem Wasser hergestellt. Das Substrat setzt sich aus den folgenden 3 Oligonucleotiden (IBA Göttingen) zusammen:

1. Sub_G:

5'-Cy5-CCATACCAGCCAGCCACAArGCAAGCCACCGAAGCACAGATA-RhG-3'
(SEQ_ID No. 10)

15 2. T1_Sub_Li:

5'-GTGGCTGGCTGGTATGGA-3' (SEQ_ID No. 7)

3. T1_Sub_Re:

5'-TATCTGTGCTTCGGTGGC-3' (SEQ_ID No. 8)

Durch die nachfolgend beschriebene Hybridisierung werden die 3 Bestandteile wie folgt zu einem doppelsträngigen Substrat aneinander angelagert:

Hybridisierungs-Ansatz:

1000 pmol Sub_G

1200 pmol T1_Sub_Li

1200 pmol T1_Sub_Re

25 20 µl MES (1 mol/Liter, pH 6,0)

ad 1000 µl DEPC-H₂O

Hybridisierungs-Programm:

1. 10 s 94°C;

2. Abkühlen auf 25 °C mit 0,1 °C/s

3. 4 °C

1.10 Inkubation der Protein-Proben mit dem Substrat

In einer MTP werden jeweils 10 µl des doppelsträngigen Substrates pro Well vorgelegt. Dazu werden jeweils 10 µl der aus dem Periplasma isolierten Protein-Proben hinzugegeben, die MTP luftdicht verschlossen und dunkel für 24 h bei 37 °C inkubiert.

Anschließend werden jeweils 5 µl dieser Ansätze in eine MTP mit Glasboden überführt und mit jeweils 250 µl Puffer C (100 mmol/Liter MES, pH 6,0, 100 mmol/Liter NaCl, 2 mmol/Liter EDTA) gemischt.

1.11 Aktivitätsbestimmung

5 Zur Bestimmung der Enzymaktivität wird die Platte mit Glasboden, in die die Inkubationsansätze wie unter 1.10 beschrieben überführt wurden, am Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskop ConfoCor 2 (Evotec Biosystems, Hamburg und Carl Zeiss Microscopy, Jena) vermessen. Die Auswertung der Daten erfolgt mit der ConfoCor 2-Software (Version 2.5).

10 Für die Messungen wird ein Argon-Laser ($\lambda = 488 \text{ nm}$) zur Anregung von RhG in Kombination mit einem Helium/Neon-Laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$) für Cy5 eingesetzt. Das FCS-Messvolumen in den Kavitäten wurde 200 µm über der Glasbodenoberfläche justiert. Die Messungen erfolgen für 20 s pro Well.

Durch eine Kreuzkorrelationsanalyse der erhaltenen Daten kann auf eine eventuelle
15 Spaltung des Substrates geschlossen werden. Eine Spaltung des Substrates durch RNase T1 führt zu einer Entkopplung der beiden Fluoreszenzfarbstoffe und somit zum Verlust des Kreuzkorrelationssignales. Ungeschnittene Substrat-Moleküle tragen hingegen beide Farbstoffe und liefern ein hohes Signal.

Durch die Aufteilung der durch die Transformation erhaltenen 3 Millionen Klone und
20 das Mischungsverhältnis zwischen aktiver RNase T1 Wildtyp und inaktiver RNase T1 His92Ala von 1 : 1.000.000 sollten theoretisch 3 Wells mit Aktivität durch die Messungen detektierbar sein. Statistische Abweichungen zwischen 1 bis 5 Wells mit Aktivität sind jedoch möglich.

25 **Fig. 1** zeigt die so erhaltenen Messdaten für ein nach Punkt 1 bis 1.11 hergestellte RNase T1-Testbibliothek bestehend aus 3 Millionen Klonen auf einer Platte mit einem Mischungsverhältnis von RNase T1 Wildtyp und RNase T1-His92Ala von 1 : 1.000.000. Die RNase T1-Aktivität wurde wie oben beschrieben mittels Kreuzkorrelationsanalyse detektiert. Für eine bessere Übersicht wurde eine reziproke
30 Darstellung gewählt, d.h. hohe Peaks bedeuten ein niedriges Signal und niedrige Peaks ein hohes Signal. Fig. 1 zeigt 2 deutliche Peaks, die durch einen Verlust des

Kreuzkorrelationssignals hervorgerufen werden. Diese beiden Peaks zeigen, dass in dem Experiment eine RNase T1-Aktivität in zwei von 96 Wells sicher vorhanden war.

2. Reisolation der Teilbibliothek

- 5 In der nach Punkt 1 erhaltenen Platte mit den aufbewahrten Bakterienpellets aus der Proteinpräparation wird in einem der Wells, welche in der Aktivitätsbestimmung (Punkt 1.11) eine RNase T1-Aktivität gezeigt hat, eine Plasmidpräparation mittels dem QIAprep Minipräparations-Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt.
- 10 Durch die ursprüngliche Aufteilung von 3 Millionen Klonen auf die Platte ergab sich eine Anzahl von $3.000.000 / 96 = 31.250$ unterschiedlichen Klonen pro Well. Es besteht somit in der isolierten Teilbibliothek ein Mischungsverhältnis von RNase T1 Wildtyp zu RNase T1 His92Ala von 1 : 32.250.

2.1 Weitere Vereinzelungen

- 15 Durch eine Transformation von verschiedenen Aliquots der so erhaltenen Teilbibliothek analog der vorgehensweise von Punkt 1.6 wurde die Menge von Plasmid-DNA bestimmt, welche notwendig ist, um nun ca. 100.000 transformierte Klone mittels Elektroporation zu erhalten.

- 20 Anschließend wurde die bestimmte Menge der Teilbibliothek in den Expressionsstamm transformiert und das gleiche Verfahren wie für die ursprüngliche Testbibliothek durchlaufen. Da ca. 100.000 Klone aufgeteilt wurden und das neue Mischungsverhältnis 1 : 32.250 betrug, waren wieder theoretisch 3 Wells mit detektierbarer Aktivität zu erwarten.

- 25 Die Plasmide wurden wiederum in einer der Wells mit Aktivität aus dem Bakterienpellet reisoliert. Das Mischungsverhältnis in dieser erneut angereicherten Teilbibliothek war nun $100.000 / 96 = 1050$.

- 30 Eine weitere Wiederholung des dargestellten Schemas mit einer Aufteilung von jetzt ca. 3000 Klonen ergab eine nochmals angereicherte Teilbibliothek mit einem Mischungsverhältnis von $3000 / 96 = 31$.

Indem von dieser letzten Teilbibliothek 96 Klone auf eine MTP aufgeteilt wurden, resultierten daraus 3 Wells mit Aktivität. Da diese Aktivitäten nun jeweils von einem

vereinzelten Klon verursacht wurden, konnte diesem die Aktivität von RNase T1 Wildtyp direkt zugeordnet werden.

Ausführungsbeispiel 2

- 5 Wildtyp RNase T1 spaltet RNA hoch spezifisch nach Guanosin-Resten. Zielstellung dieses Ausführungsbeispiels ist es RNase T1 Varianten, die RNA nach Adenosin-Resten spalten können, zu erhalten. Hierfür wurde eine RNase T1-Bibliothek erstellt und nach entsprechenden Varianten durchmustert.

1. Design der Bibliothek

- 10 Der zu mutierende Bereich des Guanin-Bindungsloops 1 umfasst die Aminosäuren 41 bis 57 von RNase T1 Wildtyp (SEQ_ID No. 3). Die Loop 1-DNA-Sequenz wird durch ein entsprechend synthetisiertes Mutagenese-Oligodesoxynucleotid Loop1_32 (SEQ_ID No. 9) so mutiert, dass je Variante 3 bis 4 der 17 Aminosäuren zufällig durch andere ersetzt werden. Dazu wird folgende Sequenz synthetisiert:

15 5'-GTAGGATCCAATTCTTACCCACAC aay tax aax aax tax gay ggz ttz gaz
ttx tcz gty agx tcz ccx tax tax GAATGGCCTATCCTCTCGAGCGG-3'

- in der „n“ (A, G, C oder T - „any“) und „b“ (G, C oder T – nicht A) aus SEQ_ID No. 9
20 wie folgt näher definiert sind:

a = 86 % A	6 % C	4 % G	x = c' = 88 % C	6 % G	6 % T
c = 86 % C	6 % A	4 % G	y = g' = 82 % G	11 % C	7 % T
g = 79 % G	8 % A	8 % C	z = t' = 82 % T	11 % C	7 % G
t = 79 % T	8 % A	8 % C			

mit A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin.

- Das Oligonucleotid Loop1_32 (IBA, Göttingen, Germany) wird anschließend in einer
25 PCR direkt als Primer (unter Punkt 3.1) eingesetzt.

2. Herstellung des Vektors für das Screening

In den Vektor pETBlue-2 (SEQ_ID No. 6) wird, wie in Ausführungsbeispiel 1 (Punkt 1.1. – 1.3.) beschrieben, das Gen für RNase T1 Wildtyp (SEQ_ID No. 3) inklusive des Signalpeptides für eine periplasmatische Expression kloniert und der Vektor pETBlue-
 5 RNaseT1-Wildtyp erhalten.

Anschließend wird der Vektor pETBlue-RNaseT1-Wildtyp mit PvuII und SspI (beide MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) verdaut:

Ansatz:

10 4 µg pETBlue-2
 2 µl 10x Puffer G (MBI)
 10 U SspI
 10 U PvuII
 ad 20 µl H₂O dest.

15 Der Restriktionsverdau-Ansatz wird 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Enzyme für 20 min bei 80 °C inaktiviert. Die Produkte werden auf einem 0,8 %igen Agarose-Gel getrennt und die Produktbande bei 2498 bp aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wird daraufhin mittels des QIAquick Gel-Extraktions-Kit (Qiagen, Hilden)
 20 reisoliert. 200 fmol des isolierten Fragmentes werden in einer Ligation rezirkularisiert:

Ansatz:

	200 fmol	Fragment
	2 µl	10x Ligase-Puffer (MBI)
	2 µl	50 % PEG (MBI)
25	1 µl	T4-DNA-Ligase
	ad 20 µl	H ₂ O dest.

Der Ansatz wird 8 h bei 16 °C inkubiert und anschließend wird das Enzym durch 10-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert. 1 µl dieses Ansatzes wird direkt zur
 30 Transformation kommerziell erhältlicher kompetenter ElectroTen-Zellen (Stratagene, La Jolla, USA) mittels Elektroporation eingesetzt. Die elektroporierten Zellen wurden auf Festagar-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Ausgehend von einer resultierenden Einzelkolonie wird das fertige Plasmid mittels des

Plasmid-Reinigungskits QIAprep Minipräparations-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift reisoliert. Das so erhaltene Plasmid wird als pETMini_RNaseT1_Wildtyp bezeichnet.

5 3. Klonierung der Bibliothek RNase T1-Loop1

Mit den beiden Primern Loop1_32 (SEQ_ID No. 9) und A2Hi_PstI (SEQ_ID No. 2) (beide IBA Göttingen) wird ein Teil des für RNase T1 Wildtyp (SEQ_ID No. 3) aus dem Ursprungsvektoren pA2T1 (SEQ_ID No. 5) durch eine PCR unter den nachfolgenden Bedingungen amplifiziert.

10 3.1 PCR:

PCR-Ansatz:	10 µl	10x Taq-Puffer (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)	
	2 µl	dNTPs (je 10 mmol/Liter)	
	100 pmol	Primer Loop1_32	(wie aus Punkt 1)
	100 pmol	Primer A2Hi_PstI	(SEQ_ID No. 2)
15	1 µl	Ursprungsvektor (20 ng)	(SEQ_ID No. 5)
	2 U	Taq-Polymerase (MBI)	
	ad 100 µl	H ₂ O dest.	

Temperaturprofil der PCR: 2 min / 94 °C

20	1.	45 sec / 94 °C (Denaturierung)	} 30 x
	2.	45 sec / 57 °C (Anlagerung)	
	3.	30 sec / 72 °C (Elongation)	
		2 min / 72 °C	

25 Die resultierenden PCR-Produkte werden mittel des QIAquick PCR-Reinigungs-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift gereinigt.

3.2 Restriktionsverdau:

30 Zur Klonierung der Bibliothek in den Expressionsvektor pETMini_RNaseT1_Wildtyp werden das PCR-Produkt und der Vektor mittels Restriktionsendonucleasen BamHI und PstI (alle MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) wie folgt inkubiert:

Restriktionsverdau-Ansätze:

PCR-Produkte:

5 2 µg PCR-Produkt
 2 µl 10x Puffer G⁺ (MBI)
 10 U BamHI
 10 U PstI
 ad 20 µl H₂O dest.

Vektor:

 4 µg pETMini_RNaseT1_Wildtyp
 2 µl 10x Puffer G⁺ (MBI)
 10 U BamHI
 10 U PstI
 ad 20 µl H₂O dest.

- 10 Die Restriktionsverdau-Ansätze werden 2 h bei 37 °C inkubiert. Zu dem „Vektor-Ansatz“ wird anschließend zur Dephosphorylierung 1 U SAP (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) hinzu gegeben und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Enzyme für 20 min bei 80 °C inaktiviert. Die Produkte werden auf einem
- 15 0,8 %igen Agarose-Gel getrennt und bei dem Vektoransatz die Produktbande bei 2608 bp und bei dem PCR-Ansatz die Produktbande bei 259 bp aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wird daraufhin mittels des QIAquick Gel-Extraktions-Kit (Qiagen, Hilden) aus den Gel-Stücken reisoliert.

3.3 Ligation, Transformation in *E. coli* und Plasmid-Reisolation

- 20 Die Vektor-DNA und das PCR-Produkt werden durch die Inkubation mit T4-DNA-Ligase wie folgt miteinander verbunden:

Ligase-Ansatz:

200 fmol	Vektor-DNA
600 fmol	PCR-Produkt
3 µl	10x Ligase-Puffer (MBI)
1 µl	T4-DNA-Ligase
ad 30 µl	H ₂ O dest.

25

- 30 Die Ansätze werden 8 h bei 16 °C inkubiert und anschließend wurde das Enzym durch 10-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Die Enzyme werden mit 2-maligen Ausschütteln mit Phenol/Chloroform aus der Lösung entfernt und die erhaltene wässrige Lösung durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens Ethanol durch Inkubation für 1 h bei -20 °C gefällt. Der Ansatz wird anschließend 30 min bei 13000 Upm, 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 50 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren 15 minütigen Zentrifugation bei 13000 Upm, 4 °C wird der Ethanol abgenommen und

das DNA-Pellet getrocknet. Anschließend wird die DNA in 3 µl H₂O dest. aufgenommen direkt zur Transformation kommerziell erhältlicher kompetenter ElectroTen-Zellen (Stratagene, La Jolla, USA) mittels Elektroporation eingesetzt. Von den elektroporierten Zellen werden 10 µl auf Festagar-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Der Rest der elektroporierten Zellen wird direkt in 100 ml Flüssigmedium (LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt (alles Becton Dickinson, Heidelberg), 10 g NaCl (Sigma, Deisenhofen)) mit Ampicillin verdünnt und ebenfalls über Nacht inkubiert. Die Kolonien auf der Festagar-Platte werden ausgezählt und aus dem Wert die Größe der Gesamtbibliothek bestimmt. Ausgehend von 5 ml der in Flüssigkultur gewachsenen Klonmischung wird die fertige Plasmid-Bibliothek mittels des Plasmid-Reinigungskits QIAprep Minipräparations-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift reisoliert. Als Resultat erhält man eine Bibliothek aus bis zu 10⁷ verschiedenen RNaseT1_Loop1_Varianten: pETMini_RNaseT1_L1.

3.4 Herstellung des Expressionsstammes:

Für die Expression der RNase T1-Testbibliothek wird ein *E. coli* Stamm benötigt, bei dem die RNase I ausgeschaltet ist. Entsprechende Stämme, wie z. B. AT9 (rna-19 λ⁻ gdhA2 relA1 spoT1 metB1) sind über das *E. coli* Genetic Stock Center New Haven, USA verfügbar. Der im Beispiel verwendete Expressionsvektor pETBlue-2 benötigt zusätzlich die T7-RNA-Polymerase für die Expression, welche in *E. coli* nicht vorhanden ist. Mit dem kommerziell erhältlichen λDE3-Lysogenisierungs-Kit (Novagen, Madison, USA) wird nach Herstellervorschrift das T7-RNA-Polymerase codierende Gen in den *E. coli* Stamm AT9 eingeführt. Hierdurch erhält man einen *E. coli* Stamm, der sich durch die Abwesenheit von RNase I und das Vorhandensein der T7-RNA-Polymerase (DE3) auszeichnet. Von diesem Stamm wurden mittels Standard-Molekularbiologie-Methoden elektrokompente Zellen hergestellt und bei -80 °C gelagert.

3.5 Transformation des Expressionsstammes mit der Bibliothek:

In den wie oben beschrieben hergestellten Expressionsstamm wird 1 ng der Bibliothek pETMini_RNaseT1_L1 mittels Elektroporation transformiert und die resultierenden Zellen nach 1-stündigem Wachstum bei 37 °C in 200 ml Flüssigmedium (LB-Medium:

10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt (alles Becton Dickinson, Heidelberg), 10 g NaCl (Sigma, Deisenhofen)) mit Ampicillin aufgenommen.

10 ml der so erhaltenen Vorkultur werden sofort auf eine 96-Well Mikrotiterplatte (MTP) aufgeteilt (je 100 µl pro well) und über Nacht bei 30 °C und 800 Upm inkubiert.

5 Dadurch werden ca. 150.000 Klone auf der MTP erhalten.

3.6 Wachstum der Hauptkultur und Expression von RNase T1

10 Eine 96er Deepwellplatte (DWP) wird mit jeweils 1,5 ml Flüssigmedium mit Ampicillin pro Well befüllt. Das Medium wird mit jeweils 50 µl aus der Vorkultur-MTP beimpft und die DWP bei 37 °C und 800 Upm kultiviert. Beim Erreichen einer optischen Dichte OD₆₀₀ der Kulturen von OD₆₀₀ = 1,0 werden die Kulturen mit 1 mmol/Liter IPTG induziert. Anschließend wird die Platte für weitere 4 h bei 37 °C und 800 Upm inkubiert.

3.7 Präparation der Protein-Proben

15 Durch das Signalpeptid ompA werden die exprimierten RNase T1 – Moleküle in den periplasmatischen Raum des Expressionsbakteriums geleitet. Durch einen osmotischen Schock können die Proteine sehr leicht präpariert werden. Die Reinigungsprozedur umfasst dabei folgende Schritte:

- Sammeln der Zellen durch Zentrifugation bei 4000 Upm, 4 °C für 5 min
- 20 • Abschütten des Medien-Überstandes
- Resuspension des Bakterienpellets in jeweils 25 µl Puffer A (50 mmol/Liter Tris/HCl, pH 7,5, 10 mmol/Liter EDTA, 15 % Saccharose w/v)
- Inkubation auf Eis für 30 min
- Zugabe von jeweils 125 µl Puffer B (50 mmol/Liter Tris/HCl, pH 7,5, 10
- 25 mmol/Liter EDTA)
- Zentrifugation bei 4000 Upm, 4 °C, für 20 min
- Abnahme des Überstandes und Überführung in eine MTP (Periplasma)
- Aufbewahren der Bakterienpellets

3.8 Herstellung des Substrates für RNase T1

Als Substrat (Sub_A) dient ein doppelsträngiges DNA-Molekül mit zentralem einzelsträngigen Bereich, welcher nun einen Adenosin-RNA-Baustein (rA) als Angriffspunkt für das Enzym enthält. Die Enden dieses Substrates sind mit unterschiedlichen Farbstoffen für den roten (Cy5 am 5'-Ende) und den grünen (RhG - am 3'-Ende) Spektralbereich markiert. Um ein Ausbleichen der markierten Substrate zu verhindern, werden die entsprechenden Lösungen und Inkubationsansätze stets vor Licht geschützt. Die Puffer und Ansätze werden mit DEPC-behandeltem Wasser hergestellt. Das Substrat setzt sich aus den folgenden 3 Oligonucleotiden (IBA Göttingen) zusammen:

1. Sub_A:

5'-Cy5-CCATACCAGCCAGCCACAACACAAGCCACCGAAGCACAGATA-RhG-3'
(SEQ_ID No. 11)

2. T1_Sub_Li:

5'-GTGGCTGGCTGGTATGGA-3' (SEQ_ID No. 7)

3. T1_Sub_Re:

5'-TATCTGTGCTTCGGTGGC-3' (SEQ_ID No. 8)

Durch die nachfolgend beschriebene Hybridisierung werden die 3 Bestandteile wie folgt zu einem doppelsträngigen Substrat aneinander angelagert:

20	Hybridisierungs-Ansatz:	Hybridisierungs-Programm:
	1000 pmol Sub_A	1. 10 s 94°C;
	1200 pmol T1_Sub_Li	2. Abkühlen auf 25 °C mit 0,1 °C/s
	1200 pmol T1_Sub_Re	3. 4 °C
	20 µl MES (1 mol/Liter, pH 6,0)	
25	ad 1000 µl DEPC-H ₂ O	

3.9 Inkubation der Protein-Proben mit dem Substrat

In einer MTP werden jeweils 10 µl des doppelsträngigen Substrates pro Well vorgelegt. Dazu werden jeweils 10 µl der aus dem Periplasma isolierten Protein-Proben hinzugegeben, die MTP luftdicht verschlossen und dunkel für 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden jeweils 5 µl dieser Ansätze in eine MTP mit Glasboden überführt

und mit jeweils 250 µl Puffer C (100 mmol/Liter MES, pH 6,0, 100 mmol/Liter NaCl, 2 mmol/Liter EDTA) gemischt.

3.10 Aktivitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wird die Platte mit Glasboden, in die die Inkubationsansätze wie unter 1.10 beschrieben überführt wurden, am Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskop ConfoCor 2 (Evotec Biosystems, Hamburg und Carl Zeiss Microscopy, Jena) vermessen. Die Auswertung der Daten erfolgt mit der ConfoCor 2-Software (Version 2.5).

Für die Messungen wird ein Argon-Laser ($\lambda = 488 \text{ nm}$) zur Anregung von RhG in Kombination mit einem Helium/Neon-Laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$) für Cy5 eingesetzt. Das FCS-Messvolumen in den Kavitäten wurde 200 µm über der Glasbodenoberfläche justiert. Die Messungen erfolgen für 20 s pro Well.

Durch eine Kreuzkorrelationsanalyse der erhaltenen Daten kann auf eine eventuelle Spaltung des Substrates geschlossen werden. Eine Spaltung des Substrates durch RNase T1 führt zu einer Entkopplung der beiden Fluoreszenzfarbstoffe und somit zum Verlust des Kreuzkorrelationssignales. Ungeschnittene Substrat-Moleküle tragen hingegen beide Farbstoffe und liefern ein hohes Signal.

Fig. 2 zeigt die so erhaltenen Messdaten für ein nach Ausführungsbeispiel 2 hergestellte RNase T1-Loop1-Bibliothek bestehend aus 150.000 Klonen auf einer Platte. Die RNase T1-Aktivität wurde wie oben beschrieben mittels Kreuzkorrelationsanalyse detektiert. Für eine bessere Übersicht wurde eine reziproke Darstellung gewählt, d.h. hohe Peaks bedeuten ein niedriges Signal und niedrige Peaks ein hohes Signal. Fig. 2 zeigt einen sehr deutlichen Peak, die durch einen Verlust des Kreuzkorrelationssignales hervorgerufen wird. Der Peak zeigt, dass in dem Experiment eine RNase T1-Aktivität, welche nun ein Substrat nach A spalten kann, in einem von 96 Wells vorhanden war.

4. Reisolation der Teilbibliothek

In der nach Ausführungsbeispiel 2 (Punkte 1. – 3.10.) erhaltenen Platte mit den aufbewahrten Bakterienpellets aus der Proteinpräparation wird in dem Well, welche in der Aktivitätsbestimmung (3.10) eine RNase T1-Aktivität nach Adenosin gezeigt hat,

eine Plasmidpräparation mittels dem QIAprep Minipräparations-Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

Durch die ursprüngliche Aufteilung von 150.000 Klonen auf die Platte ergab sich eine Anzahl von $150.000 / 96 = 1563$ unterschiedlichen Klonen pro Well.

5 5.1 Weitere Vereinzelungen – 1. Schritt

Durch eine Transformation von verschiedenen Aliquots der so erhaltenen Teilbibliothek analog der vorgehensweise von Ausführungsbeispiel 1 (Punkt 1.6) wurde die Menge von Plasmid-DNA bestimmt, welche notwendig ist, um nun ca. 5.000 transformierte Klone mittels Elektroporation zu erhalten.

10 Anschließend wurde die bestimmte Menge der Teilbibliothek in den Expressionsstamm transformiert und das gleiche Verfahren wie für die ursprüngliche Bibliothek durchlaufen.

Da in dem ursprünglichen Well 1563 unterschiedliche Klone vorhanden waren und ca. 5000 Klone aufgeteilt wurden, sollte der die Adenosin-spaltende Aktivität zeigende

15 Klone ca. 3-mal zu finden sein.

Fig. 3 zeigt die erhaltenen Daten für diese Teilbibliothek. Es wurde ein Well mit einer sehr hohen Aktivität und drei weitere mit ebenfalls noch deutlich vom Hintergrund unterscheidbarer Aktivität detektiert, so dass der Klon 4-mal auf der Platte vorhanden

20 war. Das Well mit dem höchsten Aktivitätswert wurde für den weiteren Vereinzelungsschritt ausgewählt. In diesem Well waren nun mehr nur noch $5000 / 96 = 52$ unterschiedliche Klone vorhanden. Die Plasmide wurden wiederum in diesem Wells aus dem Bakterienpellet reisoliert.

25 5.2 Weitere Vereinzelungen – 2. Schritt

Eine weitere Wiederholung des dargestellten Schemas mit einer Aufteilung von jetzt ca. 500 Klonen ergab eine nochmals angereicherte Teilbibliothek mit durchschnittlich $250 / 96 = 2,6$ Klonen pro Well. Der die Aktivität verursachende Klon konnte auf dieser Platte 10-mal wieder gefunden werden (Fig. 4). Von einem der Aktivität zeigendem

30 Wells wurden wiederum die Plasmide aus dem Bakterienpellet isoliert.

5.3 Weitere Vereinzelungen – 3. Schritt

Ein Aliquot dieser Plasmidmischung wurde in den Expressionsstamm elektroporiert und die Transformanten auf einer Festagar-Platte ausgestrichen und die Platte über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von den gewachsen Einzelklonen wurden 20 ausgewählt und damit
5 direkt 100 µl Vorkulturen in einer MTP wie in 3.5. angesetzt. Nach Durchlaufen der Schritte 3.6.-3.10. konnte die detektierte Aktivität nun einem Einzelklon zugeordnet werden und der Genotyp der Adenosin-spaltenden RNaseT1-Variante identifiziert werden.

Abkürzungsverzeichnis:

In der Erfindungsbeschreibung werden folgende Abkürzungen verwendet:

	<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
5	<i>C. lucknowese</i>	<i>Chrysosporium lucknowese</i>
	Cy5	Fluoreszenzfarbstoff Cy5™ (Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, GB)
	DEPC	Diethylpyrocarbonat
	DWP	Deepwellplatte
10	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
	h	Stunde
	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranosid
	LB	Luria Broth
15	MES	Morpholinoethansulfonsäure
	min	Minuten
	MTP	Microtiterplatte
	OD	optische Dichte
	OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
20	ompA	äußeres Membranprotein A aus <i>E. coli</i>
	p	Plasmid
	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
	PT7	T7-Promotor
	rA	Riboadenylsäurerest
25	rG	Riboguanylsäurerest
	Upm	Umdrehungen pro Minute
	RhG	Rhodamin Grün (Fluoreszenzfarbstoff)
	SAP	Alkalische Phosphatase aus Krabben
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Hefe)
30	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
	T4	vom Bakteriophage T4 abstammend
	U	Unit (Einheit für Enzymaktivität)
	w/v	bei Prozentangaben: Gewicht (w = weight) pro Volumen (v)

Patentansprüche

1. Verfahren zur Selektion von Biomolekülen aus Varianten-Bibliotheken von Biomolekülen umfassend die Schritte:

- 5 a.) Herstellung einer Varianten-Bibliothek, bestehend aus einer Anzahl (B_0) von Varianten, der für das Biomolekül codierenden Gensequenz, und
- b.) Aufteilung der Variantenbibliothek in eine Anzahl von Kompartimenten (W_0), die mindestens um einen Faktor 10 kleiner ist, als die Anzahl (B_0) der in der Varianten-Bibliothek enthaltenen Varianten,
- 10 wobei jedes Kompartiment eine Teilbibliothek enthält, die $K_0=B_0/W_0$ Varianten enthält,
- c.) Produktion von Biomolekülen in den Kompartimenten, und Test der in den einzelnen Kompartimenten erhaltenen Biomoleküle auf eine bestimmte Eigenschaft (Phänotyp), wobei aus dem beobachteten
- 15 Phänotyp keine direkten Rückschlüsse auf den Genotyp möglich sind,
- d.) Auswahl mindestens eines Kompartiments, in dem Biomoleküle enthalten sind, welche die gewünschten Eigenschaften erfüllen,
- e.) Aufteilung der in dem ausgewählten Kompartiment enthaltenen Teilbibliothek in weitere Kompartimente und
- 20 f.) n-faches Wiederholen der Schritte c.) bis e.) bis in jedem Kompartiment nur noch maximal eine Variante ($K_n \leq 1$) der für das Biomolekül codierenden Gensequenz enthalten ist.

25 2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die gewünschte Eigenschaft eine biokatalytische Aktivität ist.

30 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** in Schritt c.) auch eine Vervielfältigung der Teilbibliothek in den Kompartimenten bis zu einer Individuen-Anzahl $V_0(x)$ zum Zeitpunkt x pro Kompartiment erfolgt, wobei die Individuen-Anzahl $V_0(x)$ dividiert durch die Klonanzahl pro Kompartiment K_0 den Vervielfältigungsfaktor $F_0(x)$ pro Klon ergibt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** in Schritt e.) die Aufteilung unter Verdünnung der Teilbibliothek anhand des Faktors $F_0(x)$ erfolgt, so dass in einem gegebenen Volumen jeder in dem Kompartiment enthaltene Klon statistisch bis zu einer Anzahl $X_0 < W_1$ vorkommt, dieses Volumen wird auf neue Kompartimente der Anzahl W_1 aufgeteilt, wobei die neue Klonanzahl pro Kompartiment $K_1 = X_0 * K_0 / W_1$ beträgt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** Variantenbibliothek 10^3 bis 10^{15} Varianten der Gensequenz des Biomoleküls enthält.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Variantenbibliothek im Schritt b.) auf 10^1 bis 10^4 Kompartimente aufgeteilt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Variantenbibliothek vor der Aufteilung im Schritt b) in einen Organismus überführt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Kultur des Organismus nach der Aufteilung im Schritt c.) auf eine Organismenzahl von 10^8 bis 10^9 pro Kompartiment vervielfältigt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Organismen auch die Produktion der Biomoleküle durchführen.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Teilbibliotheken in den Kompartimenten aus den Organismen reisoliert werden und die Produktion der Biomoleküle durch zellfreie Systeme, durchgeführt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Vervielfältigung der Teilbibliotheken und die Produktion der Biomoleküle durch zellfreie Systeme durchgeführt wird.
- 5 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Variantenbibliothek aus DNA-Plasmiden besteht, welche die für das Biomolekül codierende Gensequenz enthalten.
- 10 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Variantenbibliothek aus linearen Nukleinsäuremolekülen besteht, welche die für das Biomolekül codierende Gensequenz enthalten.
- 15 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Biomoleküle Enzyme oder Ribozyme oder andere Biomoleküle sind, welche eine biokatalytische Aktivität besitzen.
- 20 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Test auf eine biokatalytische Aktivität mittels physikalischer Messmethoden, wie vorzugsweise der UV/VIS-Spektroskopie, der Fluoreszenz-Spektroskopie oder der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie, erfolgt.

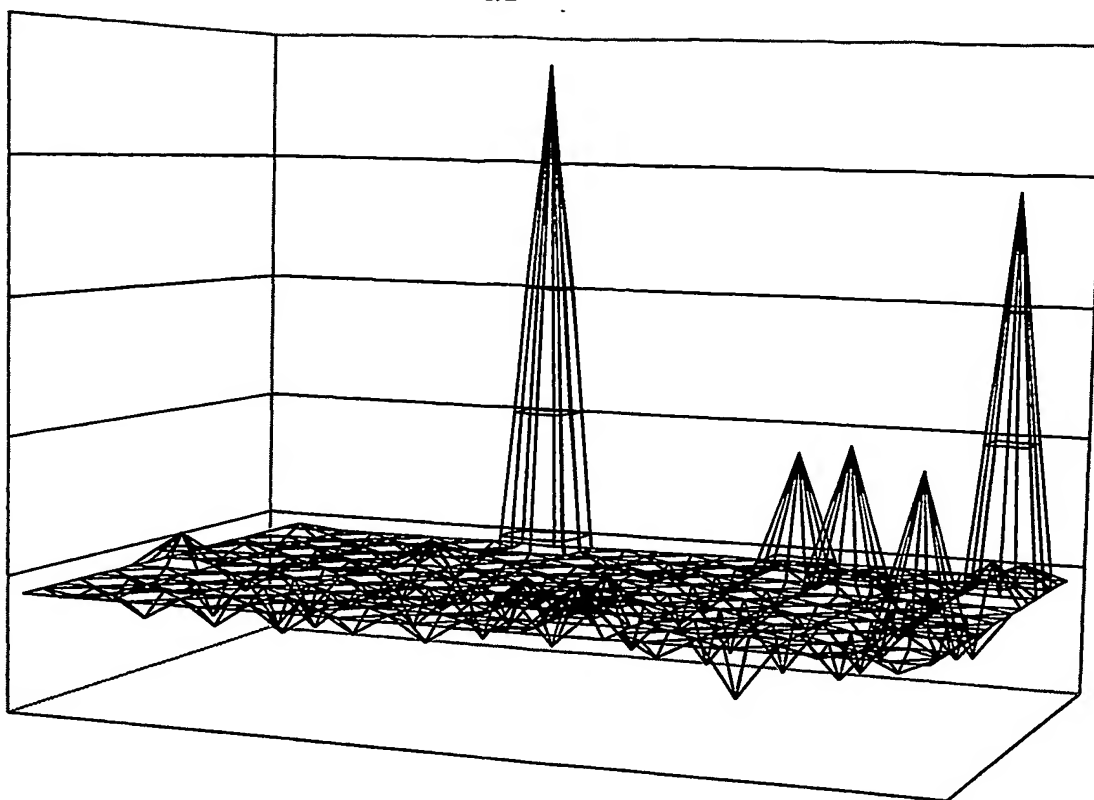


Fig. 1

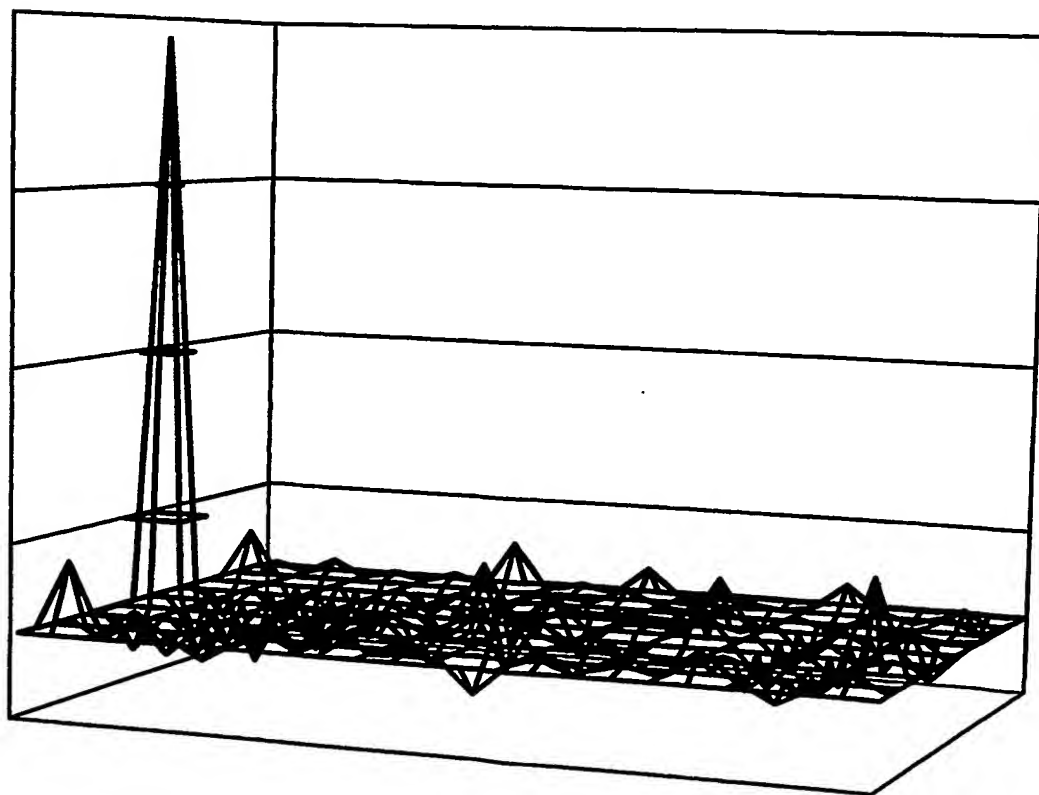


Fig. 2

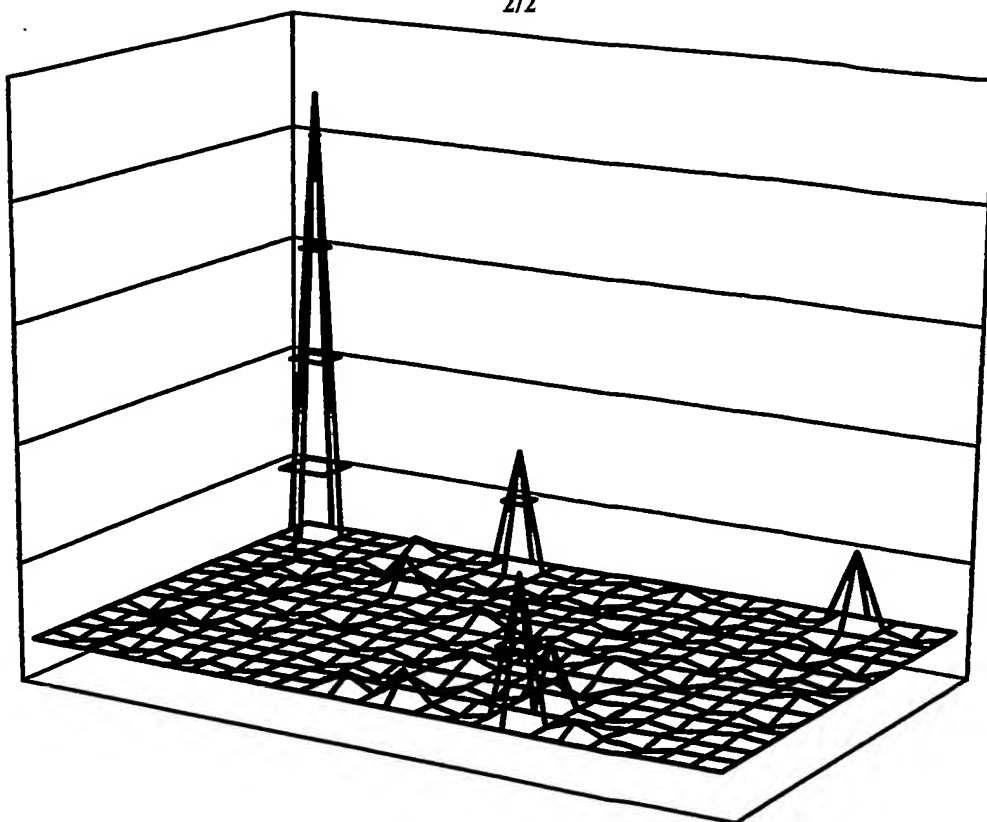


Fig. 3

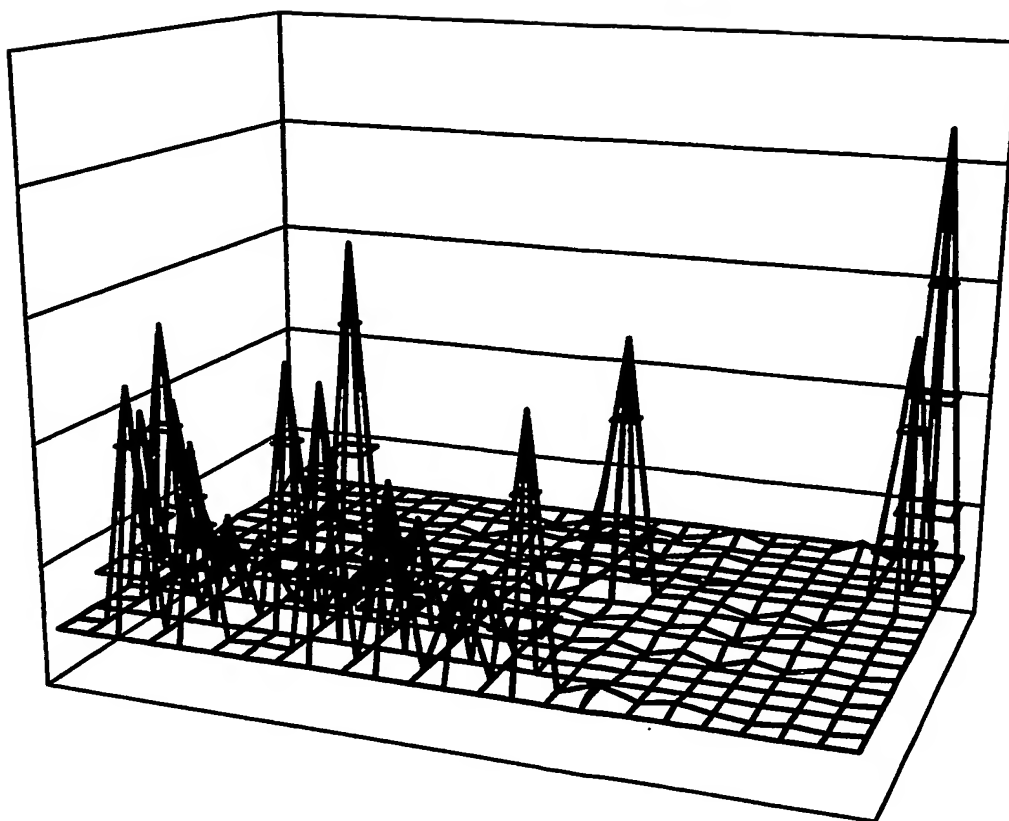


Fig. 4

SEQUENZPROTOKOLL - SEQUENCE LISTING

<110> Universität Leipzig
 <120> Verfahren zur Selektion von Biomolekülen aus Varianten-
 Bibliotheken von Biomolekülen
 <130> 401P03DPCT

 <150> DE10350474.5
 <151> 2003-10-23

 <160> 11
 <170> PatentIn version 3.3

 <210> 1
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> artificial
 <400> 1
 caattctgca gttgcgttca cgtcgttg 28

 <210> 2
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> artificial
 <400> 2
 taaggctcat gaaaaacaca gctatcgc 28

 <210> 3
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <221> ompA-Signalpeptid
 <222> (1)..(63)
 <223>
 <220>
 <221> RNase T1 Wildtyp
 <222> (64)..(378)
 <223>
 <400> 3
 atgaaaaaca cagctatcgc gattgcagtg gcactggctg gtttcgctac cgtagcgcag 60
 gccgcatgcg actacacttg cggttctaac tgctactctt cttcagacgt ttctactgct 120
 caggcggccg gatataaaact tcacgaagac ggtgaaactg ttggatccaa ttcttaccga 180
 cacaagtaca acaactacga aggttttgat ttctctgtga gctctcccta ctacgaatgg 240
 cctatcctct cgagcgggtga tgtttactct ggtgggtccc cgggtgctga ccgtgtcgtc 300
 ttcaacgaaa acaaccaact agctggtggt atcactcaca ctggtgcttc tggttaacaac 360
 ttcggtgaat gtacataa 378

<210> 4
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <221> ompA-Signalpeptid
 <222> (1)..(63)
 <223>
 <220>
 <221> RNaseT1-His92Ala
 <222> (64)..(378)
 <223>
 <400> 4
 atgaaaaaca cagctatcgc gattgcagtg gcactggctg gtttcgctac cgtagcgcag 60
 gccgcatgcg actacacttg cggttctaac tgctactctt cttcagacgt ttctactgct 120
 caggcggccg gatataaact tcacgaagac ggtgaaactg ttggatccaa ttcttaacca 180
 cacaagtaca acaactacga aggttttgat ttctctgtga gctctcccta ctacgaatgg 240
 cctatcctct cgagcgggtga tgtttactct ggtgggtccc cgggtgctga ccgtgtcgtc 300
 ttcaacgaaa acaaccaact agctgggtgtt atcactgcc a ctggtgcttc tggtacaac 360
 ttcgttgaat gtacataa 378

<210> 5
 <211> 7336
 <212> DNA
 <213> Plasmid pA2T1
 <220>
 <221> lac Promotor
 <222> (1)..(371)<223>
 <220>
 <221> ompA-Signalpeptid
 <222> (393)..(455)
 <223>
 <220>
 <221> RNaseT1-Wildtyp
 <222> (456)..(770)
 <223>
 <220>
 <221> lacI-Gen
 <222> (1664)..(2887)
 <223>
 <220>
 <221> ORI
 <222> (4924)..(5115)
 <223>
 <220>
 <221> Beta-Lactamase (Amp)
 <222> (7165)..(6302)
 <223>
 <400> 5
 taggcgtatc acgaggccct ttggataacc agaagcaata aaaaatcaaa tcggatttca 60
 ctatataatc tcactttatc taagatgaat ccgatggaag catcctgttt tctctcaatt 120
 tttttatcta aaaccagcg ttcgatgctt ctttgagcga acgatcaaaa ataagtgcc 180

tcccatcaaa	aaaatattct	caacataaaa	aacttttgtgt	aatacttgta	acgctacatg	240
gagattaact	caatctagct	agagaggctt	tacactttat	gcttccggct	cgtataatgt	300
gtggaattgt	gagcggataa	caatttcaca	caggaaacag	ctatgaccat	gattacggat	360
tcactggaac	tctagataac	gaggcgcaaa	aaatgaaaaa	cacagctatc	gcgattgcag	420
tggcactggc	tggtttcgct	accgtagcgc	aggccgcgatg	cgactacact	tgtgggtcca	480
actgctactc	ttcttcagac	gtttctactg	ctcaagcggc	cggatataaa	cttcacgaag	540
acggtgaaac	tgttggtatc	aattcttacc	cacacaaata	caacaactac	gaagggtttg	600
atttctctgt	gagctctccc	tactacgaat	ggcctatcct	ctcgagcggg	gatgtttact	660
ctggtgggtc	cccgggtgct	gaccgtgtcg	tcttcaacga	aaacaaccaa	ctagctgggtg	720
ttatcactca	cactggtgct	tctggtaaca	acttcggtga	atgtacataa	gcttggatcg	780
atccgggctg	agcaacgacg	tgaacgcaat	gcgttccgac	gttcaggctg	ctaaagatga	840
cgcagctcgt	gctaaccagc	gtctggacaa	catggctact	aaataccgca	agtaatagta	900
cctgtgaagt	gaaaaatggc	gcacattgtg	cgacattttt	tttgtctgcc	gtttaccgct	960
actgcgtcac	gcgtaacata	ttcccttget	ctggttcacc	attctgcgct	gactctactg	1020
aaggcgcatt	gctggctgcg	ggagttgctc	cactgctcac	cgaaaccgga	taccctgccc	1080
gacgatacaa	cgctttatcg	actaacttct	gatctacagc	cttattgtct	ttaaattgcg	1140
taaagcctgc	tggcagtgtg	tatggcattg	tctgaacgtt	ctgctgttct	cctgccgata	1200
gtggtcgatg	tacttcaaca	taacgcatcc	cgttaggctc	cacggaatat	ttcaccggtt	1260
cgttgatcac	tttcaccggc	gttcccgctc	gcacgctgga	gaacaaggct	ttaatattccg	1320
gtgcattcat	gcgaatacac	cctgaactga	cgcgcaaacc	gacgctgtcc	ggcgcaactgg	1380
taccatgaat	gaggtattcg	ccattaccat	gcgcgaggcg	cagtgcgtaa	cgctcctagcg	1440
ggttattttg	tccggcagga	acgactggcg	gtaatttaat	gccacgctcc	agcgaacgct	1500
gacgaatgcc	tgcgtaggc	gtccagggtg	ggtagggat	tttctgcca	acacgcgttt	1560
ccatcacccg	cgtttccagc	ccctgcaatc	caatacctat	tggataaacc	tgcacattat	1620
tttctcccg	cgataataa	taaaggcgca	gctctgcaag	gttgacacca	tcgaatggcg	1680
caaaaccttt	cgcggtatgg	catgatagcg	cccggaagag	agtcaattca	gggtggtgaa	1740
tgtgaaacca	gtaacgttat	acgatgtcgc	agagtatgcc	ggtgtctctt	atcagaccgt	1800
ttcccgcgtg	gtgaaccagg	ccagccacgt	ttctgcgaaa	acgcgggaaa	aagtggaagc	1860
ggcgatggcg	gagctgaatt	acattcccaa	ccgcgtggca	caacaactgg	cgggcaaaca	1920
gtcgttgctg	attggcggtg	ccacctccag	tctggccctg	cacgcgccgt	cgcaaattgt	1980

cgcgggcgatt	aaatctcgcg	ccgatcaact	gggtgccagc	gtggtggtgt	cgatggtaga	2040
acgaagcggc	gtcgaagcct	gtaaagcggc	ggtgcacaat	cttctcgcg	aacgcgtcag	2100
tgggctgata	attaactata	cgctggatga	ccaggatgcc	attgctgtgg	aagctgcctg	2160
cactaatgtt	ccggcgttat	ttcttgatgt	ctctgaccag	acacccatca	acagtattat	2220
tttctcccat	gaagacggta	cgcgactggg	cgtggagcat	ctggtcgcat	tgggtcacca	2280
gcaaatacg	ctgttagcgg	gcccatthaag	ttctgtctcg	gcgcgtctgc	gtctggctgg	2340
ctggcataaa	tatctcactc	gcaatcaaata	tcagccgata	gcggaacggg	aaggcgactg	2400
gagtgccatg	tccggttttc	aacaaacccat	gcaaatacgt	aatgagggca	tcgttccac	2460
tgcgatgctg	gttgccaacg	atcagatggc	gctgggcgca	atgcgcgcca	ttaccgagtc	2520
cgggctgcgc	gttggtgcgg	atatctcgg	agtgggatac	gacgataccg	aagacagctc	2580
atgttatata	ccgcggtcaa	ccaccatcaa	acaggatttt	cgctgtctgg	ggcaaaccag	2640
cgtggaccgc	ttgctgcaac	tctctcaggg	ccaggcggtg	aagggaatc	agctgttgcc	2700
cgtctcactg	gtgaaaagaa	aaaccaccct	ggcgcccaat	acgcaaaccg	cctctccccg	2760
cgcgttggcc	gattcattaa	tgagctggc	acgacaggtt	tcccactgg	aaagcgggca	2820
gtgagcgcaa	cgcaattaat	gtgagttagc	tcactcatta	ggcaccacag	gctttacact	2880
ttatgctaac	gataatcccc	tgacgcggtg	catcaggtaa	taacagttgt	gaaggatag	2940
ttatcgctgt	accaggtttt	ggcaccgggg	cgatagtgtt	attggcttca	aggatcaaca	3000
ttgcccagct	atcaaaacgt	cgggcaatag	cctgaagggt	tttatcccct	tcttgcaccg	3060
tatacgtttg	attttgccca	accagtcggc	ttccgggttg	tggtagcggg	taatcaaccg	3120
cccaggcagc	ctggatggcg	ctaaaagcgc	cgataagcgt	gagtgtgaag	aaagacgcgc	3180
gtttcattgt	aaacctcctg	tatttgccgg	agactcacgc	tgaaacgtcg	gatggcgctt	3240
atgttcacct	gaaaccaaaa	cactcctgtg	caggtcagtg	taaacattga	ccatccggca	3300
atgtgagcca	accggatgaa	agctgtcctt	ttagtttagc	taagtgcagc	ggctttggcg	3360
cgaattgcgc	gaatcatcgc	ttccagacct	tgtgaacgag	atggggtgag	atgttggtg	3420
agcgccattt	tttcaaacca	cggacgcaca	tcgaaattga	caatatcctg	cggcgtcac	3480
tgatcgtaga	gaataaagac	gaccgcaata	agccctttca	caatcgccgc	atcgctgtcg	3540
ccctgtaatt	caataattcc	ctgggcattc	tggcgcatga	caatccacac	ctgactctga	3600
cagccctgaa	tgctattttg	tggacttctg	tcttcgtcgc	gtaattctgg	cagacgctgg	3660
gggaccgatg	cccttgagag	ccttcaaccc	agtcagctcc	ttccggtggg	cgcggggcat	3720
gactatcgtc	gccgcactta	tgactgtctt	ctttatcatg	caactcgtag	gacaggtgcc	3780
ggcagcgctc	tgggtcattt	tcggcgagga	ccgctttcgc	tggagcgcg	cgatgatcgg	3840

cctgtcgctt	gcggtattcg	gaatcttgca	cgccctcgct	caagccttcg	tactgggtcc	3900
cgccaccaaa	cgtttcggcg	agaagcaggc	cattatcgcc	ggcatggcgg	ccgacgcgct	3960
gggctacgtc	ttgctggcgt	tcgcgacgcg	aggctggatg	gccttcccca	ttatgattct	4020
tctcgcttcc	ggcggcatcg	ggatgcccgc	gttgcaaggc	atgctgtcca	ggcaggtaga	4080
tgacgaccat	cagggacagc	ttcaaggatc	gctcgcggtc	cttaccagcc	taacttcgat	4140
cactggaccg	ctgatcgta	cggcgattta	tgccgcctcg	gcgagcacat	ggaacgggtt	4200
ggcatggatt	gtaggcgcgc	ccctatacct	tgtctgcctc	cccgcgttgc	gtcgcggtgc	4260
atggagcccg	gccacctcga	cctgaatgga	agccggcggc	acctcgctaa	cggattcacc	4320
actccaagaa	ttggagccaa	tcaattcttg	cggagaactg	tgaatgcgca	aaccaaccct	4380
tggcagaaca	tatccatcgc	gtccgccatc	tccagcagcc	gcacgcggcg	catctcgggc	4440
agcgttgggt	cctggccacg	ggtgcgcgatg	atcgtgctcc	tgtcgttgag	gaccocggcta	4500
ggctggcggg	gttgccctac	tggttagcag	aatgaatcac	cgatacgcg	gcgaacgtga	4560
agcgactgct	gctgcaaaac	gtctgcgacc	tgagcaacaa	catgaatggg	cttcggtttc	4620
cgtgtttcgt	aaagtctgga	aacgcggaag	tcagcgccct	gcaccattat	gttcocggatc	4680
tgcatacgag	gatgctgctg	gctaccctgt	ggaacaccta	catctgtatt	aacgaagcgc	4740
tggcattgac	cctgagtgat	ttttctctgg	tccgcgcgca	tccataccgc	cagttgttta	4800
ccctcacaa	gttcagta	ccgggcgatg	tcatacatcag	taaccocgtat	cgtgagcatc	4860
ctctctcggt	tcatacggtat	cattaccccc	atgaacagaa	atccccotta	cacggaggca	4920
tcagtgaaca	aacaggaaaa	aaccgccctt	aacatggccc	gctttatcag	aagccagaca	4980
ttaacgcctt	tgagaaaact	caacgagctg	gacgcggatg	aacaggcaga	catctgtgaa	5040
tcgcttcacg	accacgctga	tgagctttac	cgcagctgcc	tcgcgcgttt	cgtgatgac	5100
ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccg	gagacggtca	cagcttgtct	gtaagcggat	5160
gccgggagca	gacaagcccg	tcagggcgcg	tcagcgggtg	ttggcgggtg	tcggggcgca	5220
gccatgaccc	agtcacgtag	cgatagcgga	gtgtatactg	gcttaactat	gcggcatcag	5280
agcagattgt	actgagagtg	caccatatgc	ggtgtgaaat	accgcacaga	tgcgtaagga	5340
gaaaataaccg	catcaggcgc	tcttccgctt	cctcgctcac	tgactcgctg	cgtcgggtcg	5400
ttcggctgcg	gcgagcggta	tcagctcact	caaaggcggg	aatacgggta	tccacagaat	5460
caggggataa	cgcaggaaa	aacatgtgag	caaaaggcca	gcaaaaggcc	aggaaccgta	5520
aaaaggccgc	gttgctggcg	ttttccata	ggctccgccc	ccctgacgag	catcacaaaa	5580
atcgacgctc	aagtcagagg	tggcgaaacc	cgacaggact	ataaagatac	caggcgtttc	5640

ccccggaag	ctccctcgtg	cgctctcctg	ttccgaccct	gccgcttacc	ggatacctgt	5700
ccgcctttct	cccttcggga	agcgtggcgc	tttctcatag	ctcacgctgt	aggatatctca	5760
gttcggtgta	ggtcgttcgc	tccaagctgg	gctgtgtgca	cgaaccccc	gttcagccccg	5820
accgctgcgc	cttatccggt	aactatcgtc	ttgagtccaa	cccggtaaga	cacgacttat	5880
cgccactggc	agcagccact	ggtaacagga	ttagcagagc	gaggtatgta	ggcggtgcta	5940
cagagttctt	gaagtgggtg	cctaactacg	gctacactag	aaggacagta	tttggtatct	6000
gcgctctgct	gaagccagtt	accttcggaa	aaagagttgg	tagctcttga	tccggcaaac	6060
aaaccaccgc	tggtagcggg	ggtttttttg	tttgcaagca	gcagattacg	cgcagaaaaa	6120
aaggatctca	agaagatcct	ttgatctttt	ctacggggtc	tgacgctcag	tggaacgaaa	6180
actcacgtta	agggattttg	gtcatgagat	tatcaaaaag	gatcttcacc	tagatccttt	6240
taaattaaaa	atgaagtttt	aatcaatct	aaagtatata	tgagtaaact	tggtctgaca	6300
gttaccaatg	cttaatcagt	gaggcaccta	tctcagcgat	ctgtctattt	cgttcatcca	6360
tagttgcctg	actccccgtc	gtgtagataa	ctacgatacg	ggagggctta	ccatctggcc	6420
ccagtgtgc	aatgataccg	cgagaccac	gctcaccggc	tccagattta	tcagcaataa	6480
accagccagc	cggaagggcc	gagcgagaa	gtggctctgc	aactttatcc	gcctccatcc	6540
agtctattaa	ttgttgccgg	gaagctagag	taagtagttc	gccagttaat	agtttgcgca	6600
acgttgttgc	cattgctgca	ggcatcgtgg	tgtcacgctc	gtcgtttggg	atggcttcat	6660
tcagctccgg	ttcccaacga	tcaaggcgag	ttacatgata	ccccatgttg	tgcaaaaaag	6720
cggttagctc	cttcggtcct	ccgatcgttg	tcagaagtaa	gttggcgcga	gtgttatcac	6780
tcatggttat	ggcagcactg	cataattctc	ttactgtcat	gccatccgta	agatgctttt	6840
ctgtgactgg	tgagtactca	accaagtcac	tctgagaata	gtgtatgcgg	cgaccgagtt	6900
gctcttgccc	ggcgtcaaca	cgggataata	ccgcgccaca	tagcagaact	ttaaaagtgc	6960
tcatcattgg	aaaacgttct	tcggggcgaa	aactctcaag	gatcttaccg	ctgttgagat	7020
ccagttcgat	gtaaccact	cgtgcacca	actgatcttc	agcatctttt	actttcacca	7080
gcgtttctgg	gtgagcaaaa	acaggaaggc	aaaatgccgc	aaaaaaggga	ataagggcga	7140
cacggaaatg	ttgaatactc	atactcttcc	tttttcaata	ttattgaagc	atttatcagg	7200
gttattgtct	catgagcgga	tacatatattg	aatgtattta	gaaaaataaa	caaatagggg	7260
ttccgcgcac	atttccccga	aaagtgccac	ctgacgtcta	agaaaccatt	attatcatga	7320
cattaaccta	taaaaa					7336

```

<210> 6
<211> 3653
<212> DNA
<213> Plasmid pETBlue-2
<220>
<221> T7-Promotor
<222> (1)..(17)
<223>
<220>
<221> lac Operator
<222> (22)..(42)
<223>
<220>
<221> f1 ORI
<222> (1096)..(1551)
<223>
<220>
<221> Beta-Lactamase (Amp)
<222> (2556)..(1669)
<223>
<220>
<221> pUC ORI
<222> (3206)..(3250)
<223>
<220>
<221> lac Operator
<222> (3606)..(3625)
<223>
<400> 6
taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa ttcccctcta gacttacaat 60
ttccattcgc cattcagggt gcgcaactgt tgggaagggc gatcggtagc ggcctcttcg 120
ctattacgcc agcttgcgaa cgggtgggtgc gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcc 180
ggattctccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagcg agagatcttg attggctagc 240
agaataatth tgtttaactt taagaaggag atataccatg gcgatatccc gggagctcgt 300
ggatccgaat tctgtacagg cgcgcctgca ggacgtcgac ggtaccatcg atacgcgttc 360
gaagcttgcg gccgcacagc tgtatacacg tgcaagccag ccagaactcg ctctgaaga 420
cccagaggat ctcgagcacc accaccacca ccactaatgt taattaagtt gggcgttgta 480
atcatagtca taatcaatac tcctgactgc gttagcaatt taactgtgat aaactaccgc 540
attaaagcta ttcgatgata agctgtcaaa catgataatt cttgaagacg aaagggccta 600
ggctgataaa acagaatttg cctggcggca gtagcgcggt ggtcccacct gaccccatgc 660
cgaactcaga agtgaaacgc cgtagcgccg atggtagtgt ggggtctccc catgcgagag 720
tagggaactg ccaggcatca aataaaaoga aaggctcagt cgaaagactg ggcctttcgt 780
tttatctgtt gtttgtcggt gaacgctctc ctgagtagga caaatccgcc gggagcggat 840
ttgaacgttg cgaagcaacg gcccgagggg tggcgggcag gacgccgcc ataaactgcc 900
agggcatcaaa ttaagcagaa ggccatcctg acggatggcc tttttgcgtt tctacaaact 960

```

cttttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgratccg ctgagcaata actagcataa 1020
ccccttgggg cctctaaacg ggtcttgagg gggtttttgc tgaaaggagg aactatatcc 1080
ggattggcga atgggacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt gtggtggtta 1140
cgcgacgcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctccttc gctttcttcc 1200
cttcctttct cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt 1260
tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat taggggtgatg 1320
gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca 1380
cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggtct 1440
attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga 1500
ttaacaaaa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gtttacaatt tctggcggca 1560
cgatggcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag 1620
ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggtct gacagttacc aatgcttaat 1680
cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc 1740
cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat 1800
accgcgagac ccacgctcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag 1860
ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattggtg 1920
ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc 1980
tacaggcatc gtggtgtcac gtcgtcgtt tggtaggct tcattcagct ccggttccca 2040
acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg 2100
tcctccgacg gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcaactcatgg ttatggcagc 2160
actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta 2220
ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc 2280
aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg 2340
ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctggtg agatccagtt cgatgtaacc 2400
cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc 2460
aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatggtgaat 2520
actcatactc ttctttttc aatcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac 2580
tgagcgtcag acccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc 2640
gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgtaccag cgggtggttg tttgccggat 2700
caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat 2760
actgtcotte tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct 2820

```

acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt 2880
cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccgataaagg cgcagcggtc gggctgaacg 2940
gggggttcgt gcacacagcc cagcttgagg cgaacgacct acaccgaact gagataccta 3000
cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg 3060
gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg 3120
tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc 3180
tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg 3240
gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatccctga ttctgtggat 3300
aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc 3360
agcgagtcag tgagcgagga agccggcgat aatggcctgc ttctcgccga aacgtttggt 3420
ggcgggacca gtgacgaagg cttgagcgag ggcgtgcaag attccgaata ccgcaagcga 3480
caggccgatc atcgtcgcgc tccagcgaaa gcggtcctcg ccgaaaatga ccagagcgc 3540
tgccggcacc tgtctacga gttgcatgat aaagaagaca gtcataagtg cggcgacgac 3600
cgggtgaattg tgagcgctca caattctcgt gacatcataa cgtcccgcga aat 3653

```

```

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial
<400> 7
gtggctggct ggtatgga 18

```

```

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial
<400> 8
tatctgtgct tcggtggc 18

```

```

<210> 9
<211> 98
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> Primer Loop1_32
<220>
<223> compositions of n and b are further specified in the description
<400> 9
gtaggatcca attcttacc acacnnbnnb nnnbnnbnnb nnnbnnbnnb bnnbnnbnnb 60
nnbnnbnnb nnnbngaattg gcctatcctc tcgagcgg 98

```

<210> 10
<211>
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> substrate "Sub_G"
<220>
<223> the g at position 24 is a ribonucleotide
<400> 10
ccataccagc cagccacaag caagccaccg aagcacagat a 41

<210> 11
<211>
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> substrate "Sub_A"
<220>
<223> the a at position 24 is a ribonucleotide
<400> 11
ccataccagc cagccacaag caaaccaccg aagcacagat a 41